

**NATÜRLICHE UND SYNTHETISCHE
VITAMIN D-METABOLITEN
IM WACHTELEISCHALENTEST**

Martin Kopp

*Diss
München
1985*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. H. Zucker

NATÜRLICHE UND SYNTHETISCHE VITAMIN D-METABOLITEN IM WACHTELEISCHALENTEST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Martin Kopp
aus
Eschach

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. W. Leidl
Referent:	Prof. Dr. H. Zucker
Korreferent:	Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

I	Einleitung	1
II	Die Eltern	2
III	Die Eltern	3
IV	Die Eltern	4
V	Die Eltern	5
VI	Die Eltern	6
VII	Die Eltern	7
VIII	Die Eltern	8
IX	Die Eltern	9
X	Die Eltern	10
XI	Die Eltern	11
XII	Die Eltern	12
XIII	Die Eltern	13
XIV	Die Eltern	14
XV	Die Eltern	15
XVI	Die Eltern	16
XVII	Die Eltern	17
XVIII	Die Eltern	18
XIX	Die Eltern	19
XX	Die Eltern	20
XXI	Die Eltern	21
XXII	Die Eltern	22
XXIII	Die Eltern	23
XXIV	Die Eltern	24
XXV	Die Eltern	25
XXVI	Die Eltern	26
XXVII	Die Eltern	27
XXVIII	Die Eltern	28
XXIX	Die Eltern	29
XXX	Die Eltern	30
XXXI	Die Eltern	31
XXXII	Die Eltern	32
XXXIII	Die Eltern	33
XXXIV	Die Eltern	34
XXXV	Die Eltern	35
XXXVI	Die Eltern	36
XXXVII	Die Eltern	37
XXXVIII	Die Eltern	38
XXXIX	Die Eltern	39
XL	Die Eltern	40
XLI	Die Eltern	41
XLII	Die Eltern	42
XLIII	Die Eltern	43
XLIV	Die Eltern	44
XLV	Die Eltern	45
XLVI	Die Eltern	46
XLVII	Die Eltern	47
XLVIII	Die Eltern	48
XLIX	Die Eltern	49
L	Die Eltern	50

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

VERZEICHNIS

Seite

1	Einleitung	1
2	1.1.1. Allgemeines	2
3	1.1.2. Zielsetzung	3
4	1.1.3. Methodik	4
5	1.1.4. Ergebnisse	5
6	1.1.5. Diskussion	6
7	1.1.6. Zusammenfassung	7
8	1.1.7. Literaturverzeichnis	8
9	1.1.8. Anhang	9
10	1.1.9. Glossar	10
11	1.1.10. Index	11
12	1.1.11. Bibliographie	12
13	1.1.12. Literaturverzeichnis	13
14	1.1.13. Anhang	14
15	1.1.14. Glossar	15
16	1.1.15. Index	16
17	1.1.16. Bibliographie	17
18	1.1.17. Literaturverzeichnis	18
19	1.1.18. Anhang	19
20	1.1.19. Glossar	20
21	1.1.20. Index	21
22	1.1.21. Bibliographie	22
23	1.1.22. Literaturverzeichnis	23
24	1.1.23. Anhang	24
25	1.1.24. Glossar	25
26	1.1.25. Index	26
27	1.1.26. Bibliographie	27
28	1.1.27. Literaturverzeichnis	28
29	1.1.28. Anhang	29
30	1.1.29. Glossar	30
31	1.1.30. Index	31
32	1.1.31. Bibliographie	32
33	1.1.32. Literaturverzeichnis	33
34	1.1.33. Anhang	34
35	1.1.34. Glossar	35
36	1.1.35. Index	36
37	1.1.36. Bibliographie	37
38	1.1.37. Literaturverzeichnis	38
39	1.1.38. Anhang	39
40	1.1.39. Glossar	40
41	1.1.40. Index	41
42	1.1.41. Bibliographie	42
43	1.1.42. Literaturverzeichnis	43
44	1.1.43. Anhang	44
45	1.1.44. Glossar	45
46	1.1.45. Index	46
47	1.1.46. Bibliographie	47
48	1.1.47. Literaturverzeichnis	48
49	1.1.48. Anhang	49
50	1.1.49. Glossar	50
51	1.1.50. Index	51
52	1.1.51. Bibliographie	52
53	1.1.52. Literaturverzeichnis	53
54	1.1.53. Anhang	54
55	1.1.54. Glossar	55
56	1.1.55. Index	56
57	1.1.56. Bibliographie	57
58	1.1.57. Literaturverzeichnis	58
59	1.1.58. Anhang	59
60	1.1.59. Glossar	60
61	1.1.60. Index	61
62	1.1.61. Bibliographie	62
63	1.1.62. Literaturverzeichnis	63
64	1.1.63. Anhang	64
65	1.1.64. Glossar	65
66	1.1.65. Index	66
67	1.1.66. Bibliographie	67
68	1.1.67. Literaturverzeichnis	68
69	1.1.68. Anhang	69
70	1.1.69. Glossar	70
71	1.1.70. Index	71
72	1.1.71. Bibliographie	72
73	1.1.72. Literaturverzeichnis	73
74	1.1.73. Anhang	74
75	1.1.74. Glossar	75
76	1.1.75. Index	76
77	1.1.76. Bibliographie	77
78	1.1.77. Literaturverzeichnis	78
79	1.1.78. Anhang	79
80	1.1.79. Glossar	80
81	1.1.80. Index	81
82	1.1.81. Bibliographie	82
83	1.1.82. Literaturverzeichnis	83
84	1.1.83. Anhang	84
85	1.1.84. Glossar	85
86	1.1.85. Index	86
87	1.1.86. Bibliographie	87
88	1.1.87. Literaturverzeichnis	88
89	1.1.88. Anhang	89
90	1.1.89. Glossar	90
91	1.1.90. Index	91
92	1.1.91. Bibliographie	92
93	1.1.92. Literaturverzeichnis	93
94	1.1.93. Anhang	94
95	1.1.94. Glossar	95
96	1.1.95. Index	96
97	1.1.96. Bibliographie	97
98	1.1.97. Literaturverzeichnis	98
99	1.1.98. Anhang	99
100	1.1.99. Glossar	100
101	1.1.100. Index	101

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 <u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u>	1
2 <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	4
2.1 <u>Vitamin D-Stoffwechsel; Bedeutung und Funktion der verschiedenen Metaboliten</u>	4
2.2 <u>Störungen des Calcium- und Phosphor- stoffwechsels - Vitamin D₃ und seine Metaboliten in der Therapie</u>	9
2.3 <u>Chemisch synthetisierte Analoga von Vitamin D</u>	15
2.3.1 Glycoside von Vitamin D	15
2.3.2 Fluorierte Analoga der Vitamin D- Metaboliten	17
2.3.3 1,25-Dihydroxyergocalciferol	18
3 <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	21
3.1 <u>Methodik</u>	21
3.1.1 Der Wachteleischalentest	21
3.1.2 Tiermaterial	23
3.1.3 Tierhaltung	23
3.1.4 Versuchsdurchführung	24
3.1.5 Vitamin D-wirksame Diätzusätze	26
3.1.6 Die Bestimmung des Eischalentrocken- gewichts	26
3.1.7 Die Bestimmung des Knochenaschegehalts	28
3.1.8 Futterverzehr	29
3.2 <u>Versuchsbeschreibung und Ergebnisse</u>	29
3.2.1 Versuch 1	29
3.2.2 Versuch 2	33
3.2.3 Versuch 3	37
3.2.4 Versuch 4	40

4	<u>DISKUSSION</u>	43
4.1	<u>Die Eignung des Wachteleischalentests zur Bestimmung von Vitamin D-Metaboliten</u>	43
4.2	<u>Die biologische Aktivität von $24,24F_2-1,25(OH)_2D_3$, $24F-1,25(OH)_2D_3$, $1\alpha(OH)D_3$ und $1,25(OH)_2D_2$</u>	46
4.3	<u>Die biologische Aktivität von $1,25(OH)_2D_3$-Glucosiden</u>	47
4.4	<u>Die Wirkung von $24,25(OH)_2D_3$, $1,24,25(OH)_3D_3$ und der Kombination von $1,25(OH)_2D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$</u>	49
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	53
6	<u>SUMMARY</u>	55
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	57
8	<u>LEBENS LAUF</u>	72

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der Stoffwechsel von Vitamin D und die Wirkungen seiner Metaboliten auf die verschiedenen Organe, die an der Aufrechterhaltung einer normalen Calcium- und Phosphorhomöostase beteiligt sind, waren in den letzten zwei Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Krankheiten, bei denen Störungen des Vitamin D-Stoffwechsels vorliegen, sind aus der Human- und der Tiermedizin bekannt und können zum Teil mit Vitamin D selbst, zum Teil mit Metaboliten von Vitamin D erfolgreich therapiert werden. Doch auch der aktivste Vitamin D-Metabolit, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, dessen Synthese Mitte der Siebziger Jahre durch USKOKOVIĆ gelungen ist (MEIER, 1981), und der mittlerweile vor allem bei der Behandlung der renalen Osteodystrophie in der Humanmedizin eingesetzt wird, konnte nicht alle gestellten Ansprüche erfüllen. Die zu geringe therapeutische Breite, die zu hohe Calciumresorption aus dem Knochen und die bei längerer Behandlung auftretende Gefahr einer Hypercalcämie ließen die Suche nach weniger problematischen Verbindungen sinnvoll erscheinen.

Das Ziel dieser Suche ist es, Verbindungen zu finden, die ebenso wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Calciumresorption aus dem Darm erhöhen können, aber bezüglich der Calciummobilisation aus dem Knochen eine eventuell geringere Aktivität als dieser Metabolit aufweisen. Hinsichtlich dieser Kriterien wurden neben verschiedenen Vitamin D_3 -Metaboliten auch Vitamin D_2 und seine Metaboliten untersucht. Durch Fluorierung bestimmter C-Atome der Seitenkette entstanden eine ganze Reihe fluorierter Analoga von Vitamin D_3 -Metaboliten, von denen man sich ebenfalls eine andere Wirkungsweise als von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ versprach. Auch Glycoside von Vitamin D-Verbindungen wurden synthetisiert und auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mehrere dieser Vitamin-D-aktiven Substanzen, deren Synthese zum Teil erst seit kurzem möglich ist, auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Als Versuchsmodell wurde der Wachteleischalentest gewählt, ein Vitamin D-Test, der von ZUCKER und GROPP (1968) entwickelt wurde und sich bei der Bestimmung von Vitamin D₃ in Futtermitteln (GROPP und ZUCKER, 1971), bei der Aktivitätsbestimmung von Vitamin D₃-Estern (RAMBECK et al., 1981b) sowie bei der Untersuchung Vitamin D₃-aktiver Inhaltsstoffe calcinogener Pflanzen bewährt hat (RAMBECK und ZUCKER, 1982).

Die gleichen Verbindungen, die für die Untersuchungen am Wachteleischalentest zur Verfügung standen, wurden in unserem Arbeitskreis von anderen Untersuchern auf ihre Wirksamkeit beim rachitischen Hühnerküken und bei der Ratte getestet.

Am Hühnerküken hatte sich gezeigt, daß sich die Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich der Induktion des duodenalen Calcium-bindenden-Proteins (CaBP) durch zusätzliche Verabreichung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhöht (RAMBECK und ZUCKER, 1985). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob sich dieser stimulierende Effekt, den $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausübt, auch für andere Parameter, wie zum Beispiel die Calciumausscheidung über die Eischale beim Vogel, nachweisen läßt.

Neben den natürlich vorkommenden glycosidisch gebundenen Formen von Vitamin D-Metaboliten in *Solanum malacoxylon* (WASSERMANN et al., 1976) und *Cestrum diurnum* (HUGHES et al., 1977) wurden auch synthetisch hergestellte Glycoside von Vitamin D₃ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ auf ihre Wirksamkeit untersucht (RAMBECK et al., 1984a). Für die eigenen Untersuchungen standen nun erstmals drei neu synthetisierte Glucoside von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Verfügung (FÜRST

et al., 1983). Diese drei Glucoside, bei denen eine Glucopyranose jeweils in β -Stellung mit verschiedenen Hydroxylgruppen verknüpft ist ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -C-(1)-Glucosid, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -C-(3)-Glucosid, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -C-(25)-Glucosid), sollten in ihrer Aktivität untereinander und mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verglichen werden.

Die gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ deutlich höhere Aktivität von $24,24\text{F}_2$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde mehrfach beschrieben (KABAKOFF et al., 1982; IKEKAWA, 1983). Mit Hilfe des Wachteleischalentests sollte diese Verbindung mit dem monofluorierten Analogon (24F - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) und mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verglichen werden.

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, ein chemisch synthetisiertes Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, hat in verschiedenen Vitamin D-Tests eine im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterschiedliche Wirkung erbracht. Wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird auch $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zur Behandlung der renalen Osteodystrophie eingesetzt. Durch die Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die beiden Verbindungen in ihrer Wirkung auf die Calciumausscheidung über die Eischale unterscheiden. Weiter stand erstmalig $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für Untersuchungen im Wachteleischalentest zur Verfügung. Bei diesem Metabolit interessiert vor allem die Wirkung im Vergleich zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, ein synthetischer Metabolit, der sich von Ergocalciferol ableitet, unterscheidet sich möglicherweise bezüglich seiner Wirkung auf den Knochen von der entsprechenden Vitamin D_3 -Verbindung. Seine Fähigkeit, Calcium aus dem Knochen zu mobilisieren, ist vergleichsweise nicht so stark (REEVE et al., 1978). Dies könnte auch für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zutreffen, den natürlichen Metaboliten von Vitamin D_2 , dessen Synthese mittlerweile ebenfalls möglich ist (PAAREN et al., 1980). Die Aktivität dieser Verbindung sollte mit der von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verglichen werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Vitamin D₃-Stoffwechsel; Bedeutung und Funktionen der verschiedenen Metaboliten.

Vitamin D wird entweder mit der Nahrung über den Darm aufgenommen oder entsteht aus der Vorstufe 7-Dehydrocholesterol unter Einwirkung von UV-Strahlen in der Haut. Vor Entfaltung seiner Wirkung unterliegt es einer Metabolisierung. Der erste Schritt, die Hydroxylierung am C-(25)-Atom, findet hauptsächlich in der Leber statt, es entsteht 25(OH)D₃.

In der Niere, die als Hauptregelorgan des Vitamin D-Stoffwechsels angesehen wird, wird dieser Metabolit durch Hydroxylierung am C-(1)-Atom in 1,25(OH)₂D₃ umgewandelt. Die 25(OH)D₃-1-Hydroxylase, die diesen Schritt katalysiert, unterliegt einem streng geregelten Steuerungsmechanismus. Hypophosphatämie und Hypocalcämie sowie hohe Parathormonspiegel stimulieren dieses Enzym (HENRY, 1982; HENRY und NORMAN, 1984), umgekehrt wird es durch sein eigenes Produkt (1,25(OH)₂D₃) als auch durch Hyperphosphatämie und Hypercalcämie gehemmt (DELUCA und SCHNOES, 1983). Die Aktivität dieses Enzyms wird zusätzlich noch durch Calcitonin, Insulin, Prolaktin und Sexualhormone beeinflusst (NORMAN et al., 1982b). Die 25(OH)D₃-1-Hydroxylase wurde auch aus der Placenta der Ratte isoliert (TANAKA et al., 1979a). 1,25(OH)₂D₃ wird mittels eines spezifischen Transportproteins (DBP) an seine Erfolgsorgane transportiert (BOUILLON und VAN BAELEN, 1980).

Spezifische 1,25(OH)₂D₃-Rezeptoren wurden in Knochen, Darm und Niere, wo dieser Metabolit seine Hauptfunktion ausübt, aber auch in anderen Geweben, wie Nebenschilddrüse, Haut, Pankreas und Geschlechtsorganen, gefunden (NORMAN et al., 1982b). 1,25(OH)₂D₃, das aktivste Steroidhormon des Vitamin D-Stoffwechsels, induziert in der Darm-

mucosazelle die Bildung von CaBP, parallel dazu wird die Calciumresorption aus dem Darmlumen gesteigert (BISHOP et al., 1983). Außerdem beeinflusst $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Calciummobilisation aus dem Knochengewebe (WONG et al., 1972; NORMAN und HENRY, 1974) und die Calciumrückresorption in der Niere (PATERSON et al., 1982). Auch der intestinale Phosphattransport wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert (CHEN et al., 1974).

Ein weiterer Weg der Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ ist die Umwandlung in $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die durch die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase katalysiert wird. Dieses Enzym findet sich ebenfalls hauptsächlich in der Niere (KNUTSON und DELUCA, 1974), konnte aber auch im Knorpel von Huhn und Kaninchen (GARABEDIAN et al., 1978) und im Dünndarm der Ratte nachgewiesen werden (KUMAR et al., 1978). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert dieses Enzym direkt, das wahrscheinlich auch von anderen Faktoren wie Parathormon und Calciumspiegel gegensätzlich zur $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-Hydroxylase gesteuert wird (DELUCA, 1981a). Die beiden $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Hydroxylasen gewährleisten also durch ihren von verschiedenen Faktoren gegensätzlich beeinflussten Steuerungsmechanismus einen Metabolitspiegel, der seinerseits den Calcium- und Phosphatspiegel regelt.

Neben $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind heute ca. 20 andere Metaboliten bekannt, denen aber keine größere physiologische Bedeutung zugemessen wird (STERN, 1981). Die biologische Rolle von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist umstritten (TSANG, 1983). Während es von verschiedenen Autoren als unbedeutendes Zwischenprodukt angesehen wird (DELUCA, 1981a), konnten andere eine eigenständige oder eine zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgeübte Wirkung dieses Metaboliten nachweisen (NORMAN et al., 1980).

NORMAN und Mitarbeiter zeigten, daß die Eier von Hühnern und Wachteln, deren einzige Vitamin D-Quelle $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

war, bedeutend schlechtere Schlupfraten besaßen als von solchen, die sowohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhalten hatten (NORMAN et al., 1982a; NORMAN et al., 1983). Eine umfangreiche Untersuchung an Hühnern, bei der 22 verschiedene Vitamin D-abhängige Parameter erfaßt wurden, ergab, daß die gemeinsame Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dem gesamten Spektrum der Vitamin D-Wirkungen näher kommt als nur die alleinige Zufuhr von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (NORMAN et al., 1980). Außerdem gelang es diesen Autoren (NORMAN et al., 1982a), einen Rezeptor für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Parathyreoidea nachzuweisen, ein Umstand, der ebenfalls für eine Rolle von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spricht.

Dagegen konnte die Arbeitsgruppe um DELUCA mittels $24,25\text{F}_2-25(\text{OH})\text{D}_3$, das am C-(24)-Atom nicht mehr hydroxyliert werden kann (TANAKA et al., 1979b), zeigen, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine nur untergeordnete Rolle im Vitamin D-Stoffwechsel spielt. Vergleichende Untersuchungen an Ratten, die entweder $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $24,24\text{F}_2-25(\text{OH})\text{D}_3$ erhalten hatten, zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Reproduktion, Knochenaufbau und Knochenmineralisation (JARNAGIN et al., 1983; PARFITT et al., 1984; BROMMAGE et al., 1983). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen OKAMATO et al. (1983a) bei Küken. Auch zeigten Eier von Hühnern, die $24,24\text{F}_2-25(\text{OH})\text{D}_3$ erhalten hatten, ähnliche Schlupfraten wie Eier von Hühnern, denen $25(\text{OH})\text{D}_3$ zugeführt worden war. Daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein die Schlupfrate nicht erhöhen konnte, wurde darauf zurückgeführt, daß dieser Metabolit wahrscheinlich nicht ins Ei gelangen kann oder dort zu schnell abgebaut wird (AMEENUDDIN et al., 1982; HART et al., 1984).

Aus all diesen Untersuchungen wurde gefolgert, daß die 24-Hydroxylierung weder für die normale Entwicklung des Hühnerembryos noch für andere physiologische Funktionen von Vitamin D benötigt wird.

Andererseits konnte von einer Reihe von Untersuchern gezeigt werden, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich mehrerer Vitamin D-abhängiger Parameter eine Wirkung hat. Diese erwies sich aber als bedeutend niedriger als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (KANIS et al., 1982). Mehrere Untersuchungen befaßten sich mit der kombinierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und deren Wirkung auf die Parathyreoidea, den Serumcalciumspiegel sowie Knochenaufbau und -mineralisation. So konnten HENRY et al. (1977) zeigen, daß geringe Mengen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemeinsam mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ das Gewicht der Parathyreoidea bei rachitischen Hühnerküken reduzieren konnten. Die selben Mengen der beiden Metaboliten, einzeln verabreicht, verursachten keinen Effekt auf das Gewicht der Drüse, ein Umstand, der ebenfalls für eine Rolle von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spricht.

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte den Serumcalciumspiegel von hypercalcämischen Ratten, die nur geringe Dosen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhalten hatten, reduzieren (LEVINE et al., 1979).

Zum selben Ergebnis kam man bei Untersuchungen an rachitischen Ratten (KRAFT et al., 1979). Dabei konnte auch gezeigt werden, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den hypercalcämischen Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bremst.

Bei nephrektomierten Ratten konnten pharmakologische Dosen von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Knochenresorption bremsen, auch wurde die stimulierende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Knochenstoffwechsel gehemmt (PAVLOVITCH et al., 1981).

An Knochenzellkulturen von Hühnerembryonen stimulierten nur beide Metaboliten zusammen mit Parathormon Mineralisation und Ossifikation (ENDO et al., 1980; ENDO et al., 1982).

Bei Menschen, die Vitamin D-unterversorgt waren, verbesserte sich unter dem Einfluß von $25(\text{OH})\text{D}_3$ erwartungsgemäß die Knochenmineralisation, begleitet von einer Normalisierung des Calcium- und Phosphatserumspiegels. Durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnten die Mineralisationsstörungen

nicht vollständig beseitigt werden, während dies mit der kombinierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gelang (BORDIER et al., 1978). DEKEL et al. (1983) untersuchten den Einfluß von Vitamin D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Heilungsverlauf von Knochenfrakturen bei Hühnerküken. Den Küken wurde nach einer Depletionsperiode die Tibia gebrochen, anschließend erhielten sie Vitamin D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder eine Kombination dieser beiden Metaboliten. Dabei zeigte sich, daß das Kallusgewebe der Küken aus der Kombinationsgruppe eine bedeutend höhere Festigkeit aufwies als bei den anderen Küken. In einem 10 Monate dauernden Versuch an Hühnern konnte gezeigt werden, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zusätzlich zu geringen Mengen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verabreicht, auf die Wirkung dieses Metaboliten auf verschiedene Blut- und Knochenparameter einen additiven Effekt ausübt (MALLUCHE et al., 1979).

ORNOY et al. (1978), die ebenfalls die Wirkung von D-Metaboliten auf den Knochenstoffwechsel untersuchten, sehen für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verschiedene Aufgaben beim Stoffwechsel des Knochens. Während $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den Calcium- und Phosphatserumspiegel anhebt, wirkt $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direkt auf den Knochen und fördert die Mineralisierung der Knochenmatrix. BABARYKIN et al. (1982) dagegen sehen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Rolle eines "smooth regulator", der für die benötigte Grundaktivität Vitamin D-abhängiger Prozesse sorgt, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ andererseits, als "sharp regulator", der erst bei einem erhöhten Calciumbedarf in Aktion tritt. Diese Autoren konnten bei Küken durch die gemeinsame Verabreichung dieser Metaboliten eine stärkere Veränderung in Bezug auf Calcium, Phosphor und alkalische Phosphatase im Blut sowie Knochenasche und intestinale CaBP-Synthese feststellen als die, die durch die Summe der Einzelwirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verursacht wurde. Auch RAMBECK und ZUCKER (1985) konnten durch Verabreichung beider Metabo-

liten in einem bestimmten Verhältnis eine im Vergleich zu den Einzelwirkungen, überadditive Wirksamkeit in Bezug auf die CaBP-Synthese des Hühnerkükens feststellen.

Ein Teil der Aktivität von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist möglicherweise auf dessen Umwandlung durch 1-Hydroxylierung in $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zurückzuführen (HOLICK et al., 1973). Dieser Vorgang findet unter hypocalcämischen Bedingungen statt, da er durch das gleiche Enzym wie die 1-Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ katalysiert und gesteuert wird. $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ kann durch die 24-Hydroxylase unter normo- oder hypercalcämischen Bedingungen auch aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entstehen. Da $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in seiner Aktivität zwischen den beiden anderen Metaboliten liegt, erscheint es möglich, daß die beiden Hydroxylasen, neben ihrer zentralen Funktion bei der Bereitstellung der beiden Metaboliten, auch bei ihrem Abbau beteiligt sind. Inwieweit dieser Steuerungsmechanismus quantitativ an der Regulierung der Blutspiegel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und ihren zum Teil eventuell gemeinsam ausgeübten Wirkungen beteiligt ist, blieb bisher ungeklärt, er scheint jedoch eine wichtige Rolle zu spielen (KUMAR, 1984).

2.2 Störungen des Calcium- und Phosphorstoffwechsels. Vitamin D_3 und seine Metaboliten in der Therapie.

Die pharmazeutische Industrie stellt heute dem Arzt neben den altbekannten Vitaminen D_3 (Cholecalciferol) und D_2 (Ergocalciferol) auch Vitamin D_3 -Metaboliten und -Analoge zur Verfügung. In der Bundesrepublik sind zur Zeit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ im Handel.

Bei der Therapie und der Prophylaxe der klassischen Vitamin D-Mangelerkrankungen Rachitis (vor allem bei Säuglingen) und Osteomalazie (vor allem bei älteren

Menschen), sofern diese durch einen exogenen oder endogenen Mangel an Vitamin D verursacht sind (fehlende Sonnenexposition, Malabsorption, zu geringe Substrataufnahme), sind auch weiterhin Cholecalciferol oder Ergocalciferol die Mittel der Wahl. Die Zufuhr von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, dem Hauptmetaboliten, hätte sicher auch Erfolg, doch würde dabei der physiologische Steuerungsmechanismus umgangen, was zu einer Intoxikation führen könnte. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, daß noch andere Vitamin D-Metaboliten für eine korrekte Mineralisation des Knochens bedeutsam sein könnten.

Bei einer Reihe von Erkrankungen liegt die Ursache in einem Mangel an $25(\text{OH})\text{D}_3$. Chronische Hepatopathien führen zu einer Enzymstörung (Vitamin D_3 -25-Hydroxylase), es kommt zu einer verminderten Produktion von $25(\text{OH})\text{D}_3$ und dem Krankheitsbild der hepatischen Osteodystrophie.

Bei Epilepsiepatienten, die mit Hydantoin- oder Phenobarbitalpräparaten behandelt werden, wird $25(\text{OH})\text{D}_3$ zwar gebildet, jedoch aufgrund der durch die Medikamente verursachten Enzyminduktion in verstärktem Maße abgebaut und über die Galle ausgeschieden.

Die Proteinurie beim nephrotischen Syndrom bringt einen erheblichen renalen Verlust von $25(\text{OH})\text{D}_3$ mit sich.

In all diesen Fällen kann der zu niedrige $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel durch zusätzliche Vitamin D-Gaben angehoben werden (FLURY und HALDEMANN, 1981).

Die meisten Störungen des Calcium- und Phosphorstoffwechsels sind jedoch auf eine ungenügende Bereitstellung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zurückzuführen, die verschiedene Ursachen haben kann. Die Vitamin D-resistente Rachitis oder Osteomalazie, das Fanconisyndrom und die Cystinose zeigen als gemeinsames Merkmal eine Hypophosphatämie, die auf eine gestörte Phosphatrückresorption zurückzuführen ist. Zusätzlich liegt eine Insuffizienz der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-Hydro-

xylase vor. Hier erscheint die Anwendung von 1-hydroxylierten Präparaten vielversprechend (PEACKOCK et al., 1977; DREZNER et al., 1980).

Auch beim Hypoparathyreoidismus liegt ein Mangel an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vor, der entweder auf einen primären Synthesedefekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Pseudohyperparathyreoidismus) oder auf eine mangelhafte Stimulation der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-Hydroxylase zurückzuführen ist. Die Einstellung des Calciumspiegels auf einen konstanten optimalen Wert, durch pharmakologische Dosen von Vitamin D_3 , bereitet nicht selten Schwierigkeiten (AVIOLI, 1974). Die Behandlung ist mit 1-hydroxylierten Präparaten leichter zu steuern, aber trotzdem mit der Gefahr einer Hypercalcämie verbunden (BELL und STERN, 1978).

Bei der Osteoporose, einer Erkrankung, die vor allem bei Frauen nach der Menopause auftritt, ist die verringerte Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wahrscheinlich vor allem auf die Veränderungen der Sexualhormonspiegel zurückzuführen. $25(\text{OH})\text{D}_3$ wird vermehrt in $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und nicht in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt, dies hat eine verminderte Calciumabsorption zur Folge (LORE et al., 1984). Die Therapie mit 1-hydroxylierten Vitamin D_3 -Präparaten und Oestrogenen scheint erfolgreicher zu sein als die alleinige Anwendung des einen oder des anderen (CRILLY et al., 1981).

Als häufigste Ursache für einen Mangel an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird die chronische Niereninsuffizienz angesehen, in deren Folge die renale Osteopathie auftritt, verbunden mit Knochenschmerzen, Muskelschwäche und -krämpfen. Sie läßt sich anhand verschiedener Kriterien (Mineralisationsstörungen, sekundärer Hyperparathyreoidismus, Knochenumbau und Knochenmasse) in charakteristische Erscheinungsbilder einteilen (DELLING et al., 1975).

Die Schädigung der Nephronen und der Verlust der Nierenfunktion führt zu einer durch die erhöhte Phosphatretenktion bedingten Hyperphosphatämie, die ihrerseits eine

Reduktion des Serumcalciums und eine Stimulation der Nebenschilddrüse zur Folge hat. Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese kann trotz Hyperparathyreoidismus und Hypocalcämie aufgrund der Hyperphosphatämie und des fortschreitenden Verlustes von Nierenparenchym nicht mehr in genügendem Maße aufrechterhalten werden. Sowohl der sekundäre Hyperparathyreoidismus, verbunden mit dem Nichtansprechen des Knochens auf Parathormon, als auch die durch die ungenügende Bereitstellung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verursachte negative Calciumbilanz, werden als Ursache der pathologischen Veränderungen am Knochen angesehen (DELUCA, 1977; SLATOPOLSKY et al., 1975; DELUCA, 1981b; FLURY und HALDEMAN, 1981). Die Therapie dieser Erkrankung beschränkt sich infolgedessen nicht nur auf die Bekämpfung der Hyperphosphatämie, sie hat auch die Substitution von Vitamin D oder seinen Metaboliten zum Ziel. Die Problematik deren Anwendung soll am folgenden Beispiel aufgezeigt werden.

Die Verabreichung von 0,5-2,0 μg $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ oder 0,25-1,0 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu einer schnellen, dosisabhängigen Verbesserung der Calciumabsorption, einem Anstieg des Serumcalciumspiegels und zu einer Reduktion des erhöhten Parathormonspiegels. Ähnliche Effekte konnten früher nur mit hohen Dosen von Vitamin D_3 (1-2 mg) erreicht werden. $25(\text{OH})\text{D}_3$ in einer Dosis von 50-200 μg zeigt ebenfalls eine Wirkung. Der Effekt dieser beiden Verbindungen ist wahrscheinlich auf die pharmakologische Wirkung der hohen $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel zurückzuführen. Ihre Anwendung beinhaltet jedoch aufgrund ihrer Kumulation die Gefahr einer langandauernden Hypercalcämie. Auch bei der Anwendung von 1-hydroxylierten Präparaten kann es zum Auftreten einer Hypercalcämie kommen, die zur Therapieunterbrechung zwingt (SCHULZ et al., 1981). Werden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ jedoch abgesetzt, so geht der Serumcalciumspiegel schon nach 3-5 bzw. nach 5-10 Tagen zurück, bei Vitamin D_3 erst nach frühestens 20 Tagen (KANIS et al., 1981). Die Vor-

teile der 1-hydroxylierten Präparate liegen also zum einen in ihrer als Hormone direkten dosisabhängigen Wirkung auf Knochen und Darm, zum anderen in ihrer gegenüber Vitamin D_3 leichteren Steuerbarkeit.

Die therapeutische Breite von $1,25(OH)_2D_3$ dagegen ist geringer als die von Vitamin D_3 , weil dieser Metabolit bei peroraler Aufnahme in direktem Kontakt zu seinem Zielorgan, dem Darm kommt. Außerdem wird der physiologische Steuerungsmechanismus in der Niere umgangen und das weniger wirksame $24,25(OH)_2D_3$ kann nicht gebildet werden (FLURY und HALDEMANN, 1981).

Es ist bekannt, daß sich die Nierenfunktion bei Patienten mit renaler Osteodystrophie, die noch nicht dialysiert werden, unter dem Einfluß von 1-hydroxylierten Metaboliten verschlechtert (NIELSEN et al., 1980). Ob $1,25(OH)_2D_3$ selbst nephrotoxisch wirkt, oder ob die auftretende Hypercalcämie bzw. das erhöhte Produkt der Calcium- und Phosphatserumwerte für die Minderung der glomerulären Filtrationsrate verantwortlich sind, blieb noch ungeklärt (KANIS et al., 1981). CHRISTIANSEN (1983) sieht in der verminderten Produktion von $1,25(OH)_2D_3$ einen Schutzmechanismus, der eine weitere Funktionsbeeinträchtigung der Niere verhindern soll.

Nach SCHULZ et al. (1981) ist nur bei schweren Formen bestimmter Knochenerkrankungen in Folge der Niereninsuffizienz eine Indikation für $1,25(OH)_2D_3$ gegeben. Erfolge sind vor allem dann zu erwarten, wenn ein sekundärer Hyperparathyreoidismus entwickelt ist. Besteht nur eine Osteoidose mit niederem Knochenumsatz, so kann nicht mit einem Effekt auf die Mineralisationsstörungen gerechnet werden. Es wird außerdem darauf hingewiesen, daß eine nach mehrmonatiger Therapie auftretende Hypercalcämie eventuell die Remineralisierung des Skeletts signalisiert. Auch DELLING (1981) sieht nur bei Patienten, die Anzeichen eines sekundären Hyperparathyreoidismus zeigen, eine

Reduktion der Osteoidose und der Fibroosteoklasie. Durch die Verbesserung der Mineralisationsstörungen und der Reduktion von Resorption und Knochenanbau besteht jedoch die Gefahr einer Osteopenie.

Die alleinige Verabreichung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei Patienten mit renaler Osteodystrophie führte zu keiner Besserung (MUIRHEAD et al., 1980). Dagegen zeigten Patienten mit erfolgloser alleiniger Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der gemeinsamen Verabreichung dieser Metaboliten histologische und klinische Besserung (COBURN et al., 1980). Deshalb wird bei Patienten, bei denen die Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch das Auftreten von Hypercalcämien beschränkt wird, eine kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwogen, die eine stabilisierende Wirkung auf den Calciumspiegel ausüben soll (VOIGTS et al., 1983).

Auch in der Tiermedizin werden Vitamin D und seine Metaboliten eingesetzt. Die hypocalcämische Gebärpause, eine häufig bei Milchkühen zum Zeitpunkt der Geburt auftretende Störung des Mineralstoffwechsels, kann durch die prophylaktische Verabreichung von hohen Dosen Vitamin D_3 (5-10 Millionen IE) beinahe verhütet werden (GREGOROVIC et al., 1966). Noch bessere Erfolge können mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (MAZUR et al., 1980) und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (CAPEN et al., 1979) erzielt werden, wenn sie nach einem genauen Behandlungsplan wenige Tage vor der Geburt verabreicht werden. Auch Solanum malacoxylon eignet sich zur Prophylaxe der Gebärpause (ROUX et al., 1979), es muß aber mit dem Auftreten von calcinotischen Veränderungen gerechnet werden (KUNZ und HÄNICHEN, 1981). Bei Paresen wurden erhöhte $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel festgestellt, die negativ mit den entsprechenden Calciumspiegeln korreliert waren. Dagegen schienen die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel im Vergleich zu nicht erkrankten Tieren nicht verändert zu sein (KALLFELZ et al., 1983).

2.3 Chemisch synthetisierte Analoga von Vitamin D

2.3.1 Glycoside von Vitamin D

Neben den mehr als 20 bisher bekannten Vitamin D-Metaboliten (HENRY and NORMAN, 1984) wurden auch Konjugate des Vitamins und seiner Metaboliten aus Tieren und Pflanzen isoliert bzw. chemisch synthetisiert und ihre biologische Wirksamkeit untersucht.

So konnte KODICEK (1969) Vitamin D_3 -Fettsäureester aus Ratten isolieren, die Vitamin D_3 oral erhalten hatten. In *Trisetum flavescens* liegt Vitamin D_3 in veresterter Form vor (RAMBECK und ZUCKER, 1982). Die Aktivität von Vitamin D_3 -Estern ist nur wenig geringer als die des freien Vitamins (RAMBECK et al., 1981a und 1981b). Ebenfalls um ein Konjugat von Vitamin D_3 handelt es sich bei dem in der Galle von Ratten gefundenen Vitamin D_3 - β -Glucosiduronat. Diese Verbindung erwies sich nur bei in vivo-Versuchen als wirksam, wenn auch weniger als Vitamin D_3 . In vitro, ohne β -Glucoronidaseaktivität, zeigte es keine Aktivität (NAGUBANDI et al., 1980). Auch Vitamin D_2 -3- β -Glucosiduronat zeigte eine geringere Aktivität als freies Vitamin D_2 . Diese Verbindungen sind wahrscheinlich erst nach hydrolytischer Spaltung aktiv (KUMAR et al., 1982).

Die calcinogen wirkenden Inhaltsstoffe von *Solanum malacoxylon* und *Cestrum diurnum* wurden als verschiedene Glycoside von $1,25(OH)_2D_3$ identifiziert (WASSERMANN et al., 1976; HUGHES et al., 1977). Auch *Trisetum flavescens* enthält neben Vitamin D_3 eine wasserlösliche Komponente, die in ihrer Wirkung $1,25(OH)_2D_3$ -artigen Charakter besitzt (RAMBECK und ZUCKER, 1982).

Mittels verschiedener Bioassays untersuchten RAMBECK et al. (1984a) synthetisch hergestellte Glycoside von Vitamin D_3 und $1\alpha(OH)D_3$ auf ihre biologische Wirksamkeit.

Dabei zeigte sich, daß die Glucosidierung die Aktivität von Vitamin D_3 nicht vermindert. Bei Hühnerküken hatte das Vitamin D_3 -3- β -D-Glucopyranosid ungefähr 90-95 % der Aktivität des freien Vitamins. Auch bei Ratten zeigte es, oral oder intravenös verabreicht, eine ähnliche Wirkung wie Vitamin D_3 . $1\alpha(OH)D_3$ -3- β -D-Glucopyranosid hatte bei Ratten, Küken und im Wachteleischalentest nur 10 % der Aktivität des Aglykons. $1\alpha(OH)D_3$ -3- β -D-Cellobiosid war beim Küken unwirksam.

FÜRST et al. (1983) synthetisierten β -D-Glucopyranoside auch von $1,25(OH)_2D_3$, die von RAMBECK et al. (1984c) auf ihre biologische Wirksamkeit beim rachitischen Küken und bei der Ratte untersucht wurden. Das C(1)- und das C(3)-Glucosid zeigte eine geringe Aktivität, dagegen war die antirachitische Wirkung des C(25)-Glucosids bei oraler und intravenöser Verabreichung beinahe so hoch wie die des freien Metaboliten. Die Fähigkeit, Calcium aus dem Knochen von rachitischen Küken zu mobilisieren, war deutlich niedriger als bei $1,25(OH)_2D_3$ und bei allen drei Glucosiden ungefähr gleich hoch. Auch die Bindung an den intestinalen $1,25(OH)_2D_3$ -Rezeptor des Kükens, die ebenfalls gemessen wurde, war beim C(25)-Glucosid stärker als beim C(1)- und C(3)-Glucosid.

Ob die Wirkung der Glycoside von Vitamin D und seinen Metaboliten auf dem Freiwerden des Aglycons durch Hydrolyse beruht oder ob die Verbindungen direkt mit den Rezeptoren reagieren, ist nicht geklärt. Möglicherweise behindert der Zuckeranteil an den verschiedenen OH-Gruppen die Reaktion mit dem Rezeptor unterschiedlich stark und führt so zu einer Abschwächung der Wirkung.

2.3.2 Fluorierte Analoga der Vitamin D-Metaboliten

In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe von synthetischen Analoga verschiedener Vitamin D-Metaboliten hergestellt, bei denen in der Seitenkette des Moleküls Wasserstoffatome oder Hydroxylgruppen durch Fluoratome ersetzt wurden. Man erhoffte sich dadurch eine veränderte oder verstärkte Wirkung auf die Zielorgane (PARDRIDGE et al., 1979). Diese Verbindungen leisteten außerdem wertvolle Hilfe bei der weiteren Untersuchung des Vitamin D-Stoffwechsels und der Bedeutung einzelner Metabolite, insbesondere von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

So konnte eine 6fache Fluoridsubstitution in der Nähe der 25-(OH)-Gruppe (an den C-Atomen (26) und (27)) die in-vitro-Aktivität von $25(\text{OH})\text{D}_3$ erhöhen. Aufgrund der Elektronegativität der Fluoratome wird die Acidität der 25-(OH)-Gruppe erhöht und die Affinität zum Rezeptor verstärkt. Dagegen wird die in-vitro-Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch mehrfache Fluorierung an den C-Atomen (26) und (27) nicht erhöht, weil die Struktur von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dem Rezeptor schon optimal angepaßt ist. Die in-vitro-Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann demnach von keiner anderen Verbindung übertroffen werden (STERN et al., 1984).

PARDRIDGE et al. (1979) synthetisierten $25\text{F}-1,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ und stellten fest, daß diese Substanz die Mineralisation des Knochens stark stimuliert, die Calciumabsorption aus dem Darm jedoch nicht erhöht.

Um die Notwendigkeit der 24(OH)-Gruppe zu untersuchen, wurde, wie schon oben erwähnt, $24,24\text{F}_2-25(\text{OH})\text{D}_3$ synthetisiert. Die zweifache Hydroxylierung am C-Atom (24) verhindert eine Hydroxylierung in dieser Position, imitiert aber nicht deren Funktion. Die 1-Hydroxylierung wird durch die Fluorierung nicht behindert (TANAKA et al., 1979b; TANAKA et al., 1983). Diese Verbindung zeigte

in mehreren Untersuchungen bei Ratten und Küken keine qualitativ unterschiedliche Wirkung in Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ bezüglich Wachstum, Reproduktion, Ossifikation und einiger anderer Parameter (JARNAGIN et al., 1983; BROMMAGE et al., 1983, OKAMATO et al., 1983a; PARFITT et al., 1984).

Das am C-Atom (24) zweimal fluorierte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwies sich als wesentlich aktiver als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst (IKEKAWA, 1983). Bei der Ratte war die duodenale Calciumtransportrate durch $24,24\text{F}_2-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 5mal so hoch (KABAKOFF et al., 1982). Beim Küken zeigte das Fluorid eine 5-10fache Aktivität in Bezug auf den intestinalen Calciumtransport, die Calciummobilisation aus dem Knochen und die Anhebung des Calcium- und Phosphorserumspiegels (OKAMATO et al., 1983b). Die im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ höhere in-vivo-Aktivität von $24,24\text{F}_2-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist nach TANAKA et al. (1983) und STERN et al. (1984) nicht auf eine unterschiedliche Affinität zum Rezeptor, sondern auf die durch die blockierte 24-Hydroxylierung verlängerte Halbwertszeit zurückzuführen.

2.3.3 $1,25$ -Dihydroxyergocalciferol

Vitamin D_2 unterscheidet sich von Vitamin D_3 durch eine Methylgruppe am C-Atom (24) und eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen (22) und (23). Schon länger ist bekannt, daß Vitamin D_2 beim Vogel nur 1/10 bis 1/100 der Aktivität von Vitamin D_3 besitzt (STEENBOCK et al., 1932). Die Ursache dieser Diskriminierung war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Beide, Vitamin D_2 und Vitamin D_3 , werden durch das selbe Enzymsystem metabolisiert (JONES et al., 1976). Vitamin D_2 oder seine Metaboliten scheinen jedoch schneller über die Galle ausgeschieden zu werden (IMRIE et al., 1967). Durch Vergleich der

Plasmakonzentrationen von Vitamin D_2 , Vitamin D_3 und den entsprechenden 25-Hydroxymetaboliten konnten HORST et al. (1982) zeigen, daß die Ratte Vitamin D_2 bei der 25-Hydroxylierung bevorzugt, das Hühnerküken Vitamin D_2 bei diesem Vorgang diskriminiert. Vitamin D_2 erwies sich in Untersuchungen von RAMBECK et al. (1984b) mit Hilfe eines prophylaktischen und eines kurativen Kükentests ca. 80mal weniger wirksam als Vitamin D_3 . In den selben Tests zeigte das chemisch synthetisierte $1,25(OH)_2D_2$ eine nur 7- bis 8mal geringere Aktivität als der entsprechende Vitamin D_3 -Metabolit. Der Vogel scheint demnach Vitamin D_2 an zwei verschiedenen Stellen zu diskriminieren; zum einen vor seiner Metabolisierung zu $1,25(OH)_2D_2$ (schlechtere Resorption, 25-Hydroxylierung oder schnellere Ausscheidung von Vitamin D_2), zum anderen danach (geringere Aktivität von $1,25(OH)_2D_2$).

$1\alpha(OH)D_2$, ein chemisch synthetisiertes Analogon von Ergocalciferol (LAM et al., 1977) wurde ebenfalls mit Vitamin D_3 -Analoge und -Metaboliten verglichen. SJÖDEN et al. (1984) konnten zeigen, daß sich $1\alpha(OH)D_2$ und $1\alpha(OH)D_3$ in ihrer antirachitischen Wirkung auf die Ratte nicht unterschieden. REEVE et al. (1978) verglichen $1\alpha(OH)D_2$ und $1\alpha(OH)D_3$ ebenfalls an Ratten. Während sich die beiden Verbindungen in ihrer Wirkung auf die intestinale Calciumabsorption nicht unterschieden, war die Aktivität von $1\alpha(OH)D_2$, Calcium aus dem Knochen zu mobilisieren, bedeutend geringer als die von $1\alpha(OH)D_3$.

Bestätigt sich die Tatsache, daß $1\alpha(OH)D_2$ bei geringerer Toxizität die gleiche Wirksamkeit wie Vitamin D_3 -Metaboliten besitzt, so könnte diese Verbindung in der Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Störung der 1-Hydroxylase vorliegt, gegenüber $1,25(OH)_2D_3$ oder $1\alpha(OH)D_3$ Vorteile bieten. Dasselbe gilt auch für $1,25(OH)_2D_2$, den natürlichen Vitamin D_2 -Metaboliten, dessen Synthese ebenfalls möglich ist (PAAREN et al., 1980). Diese Ver-

bindung unterscheidet sich bezüglich ihrer antirachitischen Wirkung bei der Ratte, nicht von dem entsprechenden Vitamin D₃-Metaboliten (RAMBECK et al., 1984b).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Methodik

3.1.1 Der Wachteleischalentest

Schon seit längerem wird die japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) mit Erfolg als Versuchstier eingesetzt (ZUCKER et al., 1967), da sich dieses Tier durch eine Reihe von Eigenschaften für bestimmte Fragestellungen besonders eignet. Hier verdienen vor allem der geringe Platz- und Futterbedarf, die kurze Brutdauer, die schnelle Gewichtsentwicklung des Kükens, die frühe Legereife im Alter von 50 Tagen sowie die bis zum 6. Lebensmonat konstant hohe Legeleistung besonders hervorgehoben zu werden. Außerdem wird auf den intensiven Calciumstoffwechsel der Wachtelhenne hingewiesen. Pro g Körpergewicht ist die Calciumausscheidung über das Ei mehr als doppelt so hoch wie beim Huhn (ZUCKER et al., 1967). Bei der Wachtelhenne beträgt der Schalenanteil am Gesamtgewicht des Eies etwa 9 %. Die Eischale selbst besteht zu 90-94 % aus CaCO_3 , das seinerseits 40 % Calcium enthält. Pro Ei, das durchschnittlich 10,5 g wiegt, werden also 350 mg Calcium ausgeschieden. Diese enorme Mineralstoffmenge stammt sowohl aus dem Futter als auch aus den Calciumdepots der Markknochen (BRAGG et al., 1971). Die Calciumversorgung hat also neben verschiedenen anderen Faktoren wie Umgebungstemperatur und dem Alter der Legetiere einen entscheidenden Einfluß auf Eischalenqualität und -gewicht. Für die Wachtel wird ein Calciumanteil von 2-3 % im Futter empfohlen (ZUCKER et al., 1967).

Auch die Versorgung mit Vitamin D wirkt sich auf die Legeleistung, auf die Calciumausscheidung über die Eischale und somit auch auf die Eischalenqualität aus. Werden Wachtelhennen mit einer Vitamin D-armen Diät gefüttert, so sinkt schon nach wenigen Tagen die Legeleistung und

es können zunehmend dünnschalige und schalenlose Eier beobachtet werden.

Wird nach einer Depletionsperiode wieder Vitamin D_3 zugeführt, so besteht zwischen der Vitamin D-Konzentration im Futter und der Calciumausscheidung über die Eischale eine direkte lineare Beziehung. Dies trifft für eine Vitamin- D_3 -Konzentration von 20-70 % der optimalen Vitamin- D_3 -Versorgung zu (ZUCKER und GROPP, 1968; GROPP und ZUCKER, 1969). Diese Korrelation wurde zur Bestimmung von Vitamin D_3 in Futter- und Lebensmitteln genutzt. Da der Calciumanteil der Eischale auch bei unterschiedlichen Schalengewichten gleich ist, wurde der Parameter Calciumausscheidung über die Eischale durch das leichter zu bestimmende Eischalentrockengewicht ersetzt (GROPP und ZUCKER, 1971). Der Wachteleischalentest wurde nicht nur für quantitative Vitamin D_3 -Bestimmungen eingesetzt, sondern auch zur Messung der Vitamin D_3 -analogen Aktivität in *Trisetum flavescens* (ZUCKER und RAMBECK, 1981) und *Solanum malacoxylon* (RAMBECK und ZUCKER, 1982) sowie zum Wirkungsvergleich verschiedener Vitamin D_3 -Ester (RAMBECK et al., 1981b). In den vorliegenden Untersuchungen, einer Versuchsreihe mit vier Wachteleischalentests, sollte geklärt werden, ob sich dieses Verfahren, das als Bestimmungsmethode für Vitamin D_3 konzipiert war, auch zur Aktivitätsbestimmung von Vitamin D-Metaboliten und Vitamin D-Analoga eignet. Dieser Test wurde gewählt, weil er sich zum einen durch verschiedene allgemeine Vorteile auszeichnet (leichte Erfassbarkeit der Versuchskriterien, Genauigkeit, Möglichkeit der Wiederverwendung der Versuchstiere), andererseits bietet sich dieses Verfahren vor allem zur Untersuchung der "synergistischen Wirkung" von $1,25(OH)_2D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$ an. Da sich der Wachteleischalentest über eine längere Zeit erstreckt, gehen eventuell auftretende längerfristige Wechselwirkungen zwischen den beiden Metaboliten in das Versuchsergebnis mit ein.

3.1.2 Untersuchte Tiere

Die in den Versuchen eingesetzten Wachteln stammten aus der institutseigenen Wachtelzucht. Die im Versuch 1 verwendeten Wachteln waren bei Versuchsbeginn 29 Wochen alt.

Die Wachteln aus Versuch 2 wurden teilweise für die Versuche 3 und 4 wiederverwendet, nachdem sie zwischenzeitlich für 2 Wochen eine Mais/Soja-Diät mit 25 µg Vitamin D₃/kg erhalten hatten, um für die folgenden Versuche wieder gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Tiere, die in den Versuchen 2-4 eingesetzt wurden, hatten zu Beginn der jeweiligen Depletionsperiode ein Alter von 9, 20 bzw. 28 Wochen. Vor Beginn der Depletionsperiode wurden alle Wachteln mit Flügelmarken gekennzeichnet.

3.1.3 Tierhaltung

Die insgesamt 80 Käfige aus Drahtgeflecht, in denen die Wachteln während der Depletions- und Versuchsperiode gehalten wurden, wiesen je eine Grundfläche von 0,09 m² und eine Höhe von 20 cm auf. Auf vier Etagen in einer Höhe von 60, 90, 120 und 150 cm waren je 10 Käfige in zwei Metallgestellen aufgehängt. Der Kot der Tiere fiel durch den Käfigboden auf mit Bitumen beschichtetes Papier, das täglich gewechselt wurde. Um einer Futterverschwendung durch die Wachteln vorzubeugen, waren die an der Käfigvorderfront angebrachten Futtertröge mit einem Drahtgitter abgedeckt. Die Wachteln wurden über Selbsttränken mit frischem Wasser versorgt, das ebenfalls wie das Futter ad libitum aufgenommen werden konnte. Der 17 m² große Raum, in dem die Tiere gehalten wurden, war abgedunkelt und mit 4 Leuchtröhren 24 Stunden beleuchtet. Frischluft wurde durch Zwangsbelüftung zugeführt. Die Temperatur des Raumes wurde mit einem Gasofen konstant auf ca. 18-20 °C gehalten.

Die Käfige wurden mit jeweils 3 Wachteln besetzt. Der leicht geneigte Käfigboden gewährleistete ein Abrollen der Eier ohne Beschmutzung oder Beschädigung.

3.1.4 Versuchsdurchführung

Wie ZUCKER und GROPP (1968) zeigen konnten, liegt bei der Wachtelhenne nur eine geringe Speicherfähigkeit für Vitamin D₃ vor. Die Zeit zwischen Vitamin D₃-Entzug und dem ersten Auftreten von Vitamin D-Mangelercheinungen ist dementsprechend kurz.

BAUMEISTER (1972) empfahl für Versuchszwecke eine Depletionszeit von 2-3 Wochen mit anschließender Kontrolle des Eischalentrockengewichts, das zu Versuchsbeginn nicht über 40 mg/Tier/Tag liegen sollte. Damit dürfte eine genügende Depletion gewährleistet sein. Zur Depletion wurde den Wachteln eine Vitamin D-arme Mais/Soja-Diät (siehe Tabelle 1) angeboten. Die Depletionszeit war in den einzelnen Versuchen unterschiedlich lang (16-20 Tage). Vor Beginn der Versuchsreihe wurde in allen Käfigen des Stalles die Beleuchtungsintensität gemessen. Dabei ergaben sich Werte zwischen 6 und 60 lux. Bei der Einteilung in die Versuchsgruppen wurde das Eischalentrockengewicht der Wachteln am Ende der Depletionsperiode sowie die Beleuchtungsintensität der einzelnen Käfige so berücksichtigt, daß die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser beiden Einteilungskriterien in jeder Versuchsgruppe (3 bzw. 4 Käfige) gleich waren.

Die Dauer der einzelnen Versuche war unterschiedlich lang (17-19 Tage). Die Eier wurden jeweils vom 5. Versuchstag bis zum Versuchsende gesammelt.

Tabelle 1

Vitamin D-arme Basalration

(modifiziert nach ZUCKER et al., 1967)

Rationszusammensetzung (%)

Mais	48,0
Sojaextraktionsschrot (50 % Rohprotein)	36,1
Rindertalg	5,0
Molkenpulver (teilentzuckert)	1,0
Calciumcarbonat (CaCO_3)	6,0
Dicalciumphosphat ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	2,5
Kochsalz (NaCl)	0,4
Vitamin- und Spurenelementvormischung ^{*)}	1,0

^{*)} Vitamin- und Spurenelementvormischung enthält in
10 g (entsprechend 1 kg Futter) auf Sojafeinmehl

Retinol	1,5 mg	Ca-Panthotenat	15 mg
DL-Tocopherolacetat	20 mg	Nikotinsäure	25 mg
Vitamin K_3	1 mg	Mangan (als Sulfat)	65 mg
Riboflavin	4 mg	Zink (als Carbonat)	52 mg
Cyanocobalamin	0,02 mg	DL-Methionin	1800 mg

3.1.5 Vitamin D-wirksame Diätzusätze

Während der Versuchsperiode erhielten die Wachteln dasselbe Futter wie in der Depletionsperiode. Die unterschiedlichen Diätvariablen wurden in Ethanol (75 %) gelöst und in Bezug zu Vitamin D₃ äquimolar in den mit Diethylether befeuchteten Sojaschrotanteil der jeweiligen Ration eingemischt. Dieser Rationsanteil wurde über dem Wasserbad getrocknet und mit den restlichen Futterkomponenten vermischt. Um zu verhindern, daß Misch- und Pipettierfehler das Ergebnis verfälschen, wurden ab Versuch 3 gemeinsame Vormischungen jener Vitamin D-wirksamen Zusätze hergestellt, die in einem Versuch mehrfach in gleicher oder verschiedener Konzentration eingesetzt wurden.

In jedem Versuch wurden als Bezugsbasis für die Testpräparate drei suboptimale unterschiedliche Vitamin D₃-Standarddosen mitgeführt. Bei der Wahl dieser Standardkonzentrationen wurde davon ausgegangen, daß zwischen 2 und 10 µg Vitamin D₃/Futter eine lineare Beziehung zwischen Vitamin D₃-Angebot und Eischalentrockengewicht besteht (ZUCKER und GROPP, 1968).

In allen Versuchen wurden Standardrationen mit 2, 3,5 und 5 µg Vitamin D₃/kg Futter eingesetzt. In den Versuchen 2-4 wurde zusätzlich noch eine negative Kontrollgruppe mitgeführt, die das Vitamin D-arme Futter der Vorperiode erhielt. Die verschiedenen Vitamin D-wirksamen Diätvariablen, die bei den Versuchen verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3.1.6 Die Bestimmung des Eischalentrockengewichts

Die Eier wurden täglich zur gleichen Zeit, getrennt nach Käfigen, gesammelt und aufbewahrt. In 2- oder 3tägigem Rhythmus wurden sie mit der Schere aufgeschnitten, mit destilliertem Wasser wurde Eiklar und Eidotter aus

Tabelle 2

Die in den Versuchen eingesetzten Vitamin D-aktiven Diätzusätze und die entsprechenden, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)	1 µg = 40 IU	
1α,25-Dihydroxycholecalciferol		1,25(OH) ₂ D ₃
24R,25-Dihydroxycholecalciferol		24,25(OH) ₂ D ₃
1α,24R,25-Trihydroxycholecalciferol		1,24,25(OH) ₃ D ₃
1α-Hydroxycholecalciferol		1α(OH)D ₃
1α,25-Dihydroxyergocalciferol		1,25(OH) ₂ D ₂
24R-Fluoro-1,25-dihydroxycholecalciferol		24F-1,25(OH) ₂ D ₃
24,24-Difluoro-1,25-dihydroxycholecalciferol		24,24F ₂ -1,25(OH) ₂ D ₃
1α,25-Dihydroxycholecalciferol-C-(1)-8-D-Glucopyranosid		1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(1)-Glucosid
1α,25-Dihydroxycholecalciferol-C-(3)-8-D-Glucopyranosid		1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(3)-Glucosid
1α,25-Dihydroxycholecalciferol-C-(25)-8-D-Glucopyranosid		1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(25)-Glucosid

Die synthetischen Metaboliten wurden freundlicherweise von Dr. W. Meier, Firma Hoffmann-La Roche AG Basel zur Verfügung gestellt. Vitamin D₃ wurde von der Firma Merck (Art. Nr. 500 917) bezogen.

der Schale herausgespült. Die Eischalen wurden anschließend auf Petrischalen gelegt und im Trockenschrank (105°C) für 24 Stunden getrocknet. Nachdem die Schalen im Exsikkator abgekühlt waren, erfolgte die Bestimmung des Eischalentrockengewichts mittels einer Analysenwaage auf 10^{-3} g genau. Aus dem gesamten Eischalentrockengewicht einer Untereinheit (Käfig) über die gesamte Sammelperiode wurde das Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag berechnet. Dabei mußte die unterschiedliche Anzahl der Tiere pro Käfig (Verluste) berücksichtigt werden. Das Eischalentrockengewicht einer Versuchsgruppe errechnete sich aus dem Mittelwert der 3 bzw. 4 Untereinheiten.

3.1.7 Die Bestimmung des Knochenaschegehalts

In den Versuchen 1 und 4 wurde, da die Versuchstiere nicht mehr wiederverwendet werden sollten, auch der Knochenaschegehalt bestimmt. Der hohe Calciumumsatz sowie die suboptimale Versorgung der Wachteln mit Vitamin D-wirksamen Substanzen ließ erwarten, daß eine eventuell unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Diätvariablen auf die Mineralisierung des Knochens durch diesen Parameter deutlich zu machen ist. Die Wachteln wurden am Ende der Versuchsperiode durch Genickschlag getötet und der jeweils rechte Lauf wurde abgesetzt. Die Wachtelbeine wurden gruppenweise zusammengefaßt und bis zu weiteren Behandlung bei -20 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des Knochenaschegehalts erfolgte an der Tibia. Um das Ablösen der Weichteile von diesem Knochen zu erleichtern, wurden die Wachtelbeine nach dem Auftauen 10 min in destilliertem Wasser gekocht. Die von Knorpeln, Sehnen und Muskeln befreiten Tibien verblieben für 24 Stunden im Trockenschrank (105 °C) und wurden, nachdem sie im Exsikkator abgekühlt waren, gruppenweise gewogen. Die Tibien wurden im Muffelofen verascht (24 Std.; 750 °C) und nach dem Abkühlen im Exsikkator wieder gewogen. Der Knochenaschegehalt wurde als prozentualer Anteil des Knochentrockengewichts berechnet.

$$\text{Knochenaschegehalt(\%)} = \frac{\text{Gewicht der Knochen nach Veraschung}}{\text{Knochentrockengewicht}} \times 100$$

3.1.8 Futterverzehr

In den Versuchen 3 und 4 wurde der Futterverzehr der einzelnen Versuchsgruppen bestimmt und als Futterverzehr pro Tier und Tag berechnet. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Wachteln, trotz der in die Futtertröge eingelegten Drahtgitter, eine erhebliche Menge des Futters verstreuen konnten; eine Tatsache, die eine gewisse Ungenauigkeit mit sich bringt.

3.2 Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

3.2.1 Versuch 1

In dem ersten Versuch sollte vor allem geklärt werden, welche Konzentrationen für die zu untersuchenden Substanzen gewählt werden müssen, um in den Meßbereich zu kommen, in dem Vitamin D-Aktivität und Eischalentrockengewicht eine enge Korrelation aufweisen.

Als Standard dienten drei Vitamin D₃-Rationen (2, 3,5 und 5 µg/kg Futter). Da erwartet werden konnte, daß 1,25(OH)₂D₃ eine höhere Aktivität als Vitamin D₃ aufweist, wurde dieser Metabolit in zwei Rationen niedriger als das Vitamin selbst dosiert. Von 24,25(OH)₂D₃ ist bekannt, daß es in verschiedenen Versuchssystemen eine geringere Wirksamkeit als 1,25(OH)₂D₃ besitzt. Um jedoch die stimulierende Wirkung von 24,25(OH)₂D₃ auf 1,25(OH)₂D₃ zu untersuchen, sollte eine Dosierung für 24,25(OH)₂D₃ gefunden werden, bei der dieser Metabolit gerade noch nicht für sich alleine wirksam ist, denn bei Untersuchungen am Hühnerküken hatte sich gezeigt, daß in diesem Konzentrationsbereich die stimulierende Wirkung von 24,25(OH)₂D₃ auf die Aktivität von 1,25(OH)₂D₃ am stärk-

sten war (TRÖGER, 1984). Aus diesem Grund wurde $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in zwei Rationen doppelt so hoch dosiert wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (2,98 und 4,61 $\mu\text{g/kg}$ Futter). Das $24,24$ -Difluoroanalogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, von dem eine sehr hohe Aktivität erwartet werden konnte (KABAKOFF et al., 1982), wurde halb so hoch dosiert wie der Metabolit selbst (0,79 und 1,24 $\mu\text{g/kg}$ Futter). Für die drei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Glucoside wurden Konzentrationen gewählt, die doppelt so hoch wie die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen lagen (4,14 und 6,39 $\mu\text{g/kg}$ Futter).

Für diesen Versuch wurden die Wachteln 20 Tage depletiert, das durchschnittliche Eischalentrockengewicht betrug zum Ende der Depletionsperiode 50 mg/Tier/Tag. Die Versuchsdauer betrug 19 Tage. Es wurden 135 Wachteln, die zu Beginn der Depletionsperiode 29 Wochen alt waren, eingesetzt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuch 1 sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Tierzahl betrug bei Versuchsende 127. Die Verluste (6 %) verteilten sich gleichmäßig auf die einzelnen Versuchsgruppen; sie sind weniger auf die versuchsbedingte, unterschiedliche Fütterung zurückzuführen, sondern gingen vor allem zu Lasten der Haltungsbedingungen. Die meisten Verluste entstanden durch das Einklemmen und Strangulieren der Wachteln zwischen den Gitterstäben der Käfige. Ein Teil der Tiere mußte im Verlauf des Versuchs getötet werden, da sie sich durch Hochspringen gegen die Käfigdecke am Kopf verletzt hatten.

Bei den Versuchsgruppen, die die drei Standardrationen mit 2, 3,5 und 5 μg Vitamin D_3/kg Futter erhalten hatten, ergaben sich Eischalentrockengewichte von 273, 499 und 659 mg. Der Erwartung entsprechend waren die Eischalentrockengewichte eng mit den entsprechenden Vitamin D_3 -

Tabelle 3

Versuch 1

Knochenaschegehalt der Tibia (gepoolt)Eischalentrockengewicht

Diätzusatz pro kg Futter	Knochenasche- gehalt d.Tibia in % d.Knochen- trockengewichts	Eischalentrok- kengewicht in mg pro Tier und Tag	
		$\bar{x}$	$\pm s$
2,0 µg Vitamin D ₃	59,3	273	98
3,5 µg Vitamin D ₃	60,7	499	82
5,0 µg Vitamin D ₃	61,4	644	48
1,52 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	60,9	602	112
2,31 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	61,0	659	70
2,98 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	59,0	78	19
4,61 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	59,2	80	23
0,79 µg 24,24F ₂ -1,25(OH) ₂ D ₃	61,3	570	110
1,24 µg 24,24F ₂ -1,25(OH) ₂ D ₃	61,5	510	103
4,14 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(1)-Gluc	58,3	77	18
6,39 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(1)-Gluc	57,5	67	15
4,14 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(3)-Gluc	58,4	87	13
6,39 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(3)-Gluc	58,3	79	18
4,14 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(25)-Gluc	59,7	183	39
6,39 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ -C-(25)-Gluc	62,4	299	32

3 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Versuchsgruppe

Konzentrationen korreliert.

Für $1,52 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 602 mg. Eine weitere Erhöhung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration (auf $2,31 \mu\text{g}$) um ungefähr die Hälfte wirkte sich nicht in dem Maße auf das Eischalentrockengewicht (659 mg) aus. Dieser Wert lag außerhalb des linearen Bereichs der Vitamin D_3 -Standardgeraden. Die eingesetzte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration ($2,31 \mu\text{g}$) erwies sich dadurch als zu hoch.

Die Eischalentrockengewichte der beiden $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen lagen weit unter dem der Gruppe, die die niedere Vitamin D_3 -Dosierung erhalten hatte. Der Dosierungsunterschied ($2,98$ bzw. $4,61 \mu\text{g/kg}$ Futter) schlug sich nicht im Eischalentrockengewicht nieder. Die eingesetzten Konzentrationen scheinen für die Fragestellung des "synergistischen Effekts" geeignet zu sein, weil in diesem Fall nur die Aktivitätssteigerung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemessen werden soll.

Die Versuchsgruppen, die $24,24\text{F}_2-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Konzentration von $0,79$ und $1,24 \mu\text{g/kg}$ Futter erhalten hatten, ergaben ein Eischalentrockengewicht von 570 und 510 mg. Eine höhere Dosierung wirkte sich also negativ auf das Eischalentrockengewicht aus, möglicherweise aufgrund eines schon toxischen Effekts. Die Aktivität von $24,24\text{F}_2-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist also bedeutend höher als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die vier Wachtelgruppen, in deren Futter das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-C-(1)-}$ bzw. das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-C-(3)-Glucosid}$ eingemischt worden war, erbrachten Eischalentrockengewichte in nur geringen Mengen. Diese beiden Substanzen scheinen also eine geringe Vitamin-D-Aktivität zu haben. Dagegen lagen die Eischalentrockengewichtswerte der beiden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-C-(25)-Glucosid-Gruppen}$ deutlich über denen der beiden anderen Glucoside.

Die unterschiedlichen Diätzusätze wirkten sich ebenfalls deutlich auf den Knochenaschegehalt aus. Steigende Vit-

amin D_3 -Konzentrationen im Futter erhöhen den Aschegehalt der Tibia. Die Werte der $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen lagen, ähnlich wie deren Eischalentrockengewichte, eng beieinander und knapp unter der Gruppe mit der höchsten Vitamin D_3 -Dosierung.

Der Knochenaschegehalt der beiden Versuchsgruppen, die $24,25(OH)_2D_3$ erhalten hatten, lagen unter denen der niederen Vitamin D_3 -Konzentration. Das Difluorid zeigte auch bezüglich des Knochentrockengewichts eine höhere Aktivität als $1,25(OH)_2D_3$.

Die Knochenaschegehaltswerte der C-(1)- und der C-(3)- $1,25(OH)_2D_3$ -Glucosidgruppen waren mit Abstand die niedrigsten. Das $1,25(OH)_2D_3$ -C-(25)-Glucosid übertraf auch hier die Wirkung der beiden anderen Glucoside, in der höheren der beiden eingesetzten Konzentrationen sogar die höchste Vitamin D_3 -Konzentration.

3.2.2 Versuch 2

Neben den drei Standardrationen mit 2, 3,5 und 5 μg Vitamin D_3 /kg Futter wurde in diesem Versuch erstmals eine negative Kontrollgruppe, die das Vitamin D-freie Futter der Vorperiode erhielt, mitgeführt. Die Dosierungen für die $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen wurden in Vergleich zu Versuch 1 halbiert. $24,25(OH)_2D_3$ wurde nur noch in einer Konzentration eingesetzt, einmal allein und je einmal kombiniert mit den beiden $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentrationen. Die beiden Metaboliten wurden also in dem Verhältnis 1:4 bzw. 1:6 kombiniert. Die Dosierung für $24,24F_2-1,25(OH)_2D_3$ wurde aufgrund der Ergebnisse aus Versuch 1 ebenfalls reduziert. Für alle anderen in diesem Versuch erstmals eingesetzten Metaboliten und Analoga (siehe Tabelle 4b) galt es, die für den Wachteleischalentest geeignete Dosierung zu finden.

Für diesen Versuch wurden 171 Wachteln, die zu Beginn

der Vorperiode 9 Wochen alt waren, verwendet. Am Ende der 16 Tage dauernden Depletionsperiode wurde ein durchschnittliches Eischalentrockengewicht von 59 mg/Tier/Tag gemessen. Die Einteilung in die Versuchsgruppen erfolgte nach dem unter 3.1.4 beschriebenen Verfahren. Die Versuchsperiode dauerte 17 Tage.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in den Tabellen 4a und 4b aufgeführt. Von den 171 im Versuch eingesetzten Wachteln starben 11 während der Versuchsperiode (6 %). Die Verluste sind nicht auf die unterschiedlichen Diätzusätze zurückzuführen, sondern, wie auch in Versuch 1, haltungsbedingt.

In der Kontrollgruppe ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 63 mg. Die Eischalentrockengewichte der Vitamin D₃-Gruppen ergaben eine enge Korrelation mit den eingesetzten Konzentrationen.

Für 0,76 µg 1,25(OH)₂D₃ ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 183 mg, für 1,25 µg 1,25(OH)₂D₃ ein Eischalentrockengewicht von 462 mg. Diese Werte lagen im linearen Bereich der Vitamin D₃-Standardkurve. Das Eischalengewicht der Versuchsgruppe, die 4,61 µg/kg 24,25(OH)₂D₃ erhalten hatte, betrug 87 mg und lag damit nur knapp über der Kontrollgruppe. In der Gruppe, in der 1,25(OH)₂D₃, niedrig dosiert, mit 24,25(OH)₂D₃ kombiniert verabreicht wurde, deutete sich ein synergistischer Effekt an, da hier ein höheres Eischalentrockengewicht erreicht wurde als bei der Einzelverabreichung der Metaboliten. Bei höherer 1,25(OH)₂D₃-Dosierung, kombiniert mit 24,25(OH)₂D₃ wurde dieser Effekt nicht erreicht; das Eischalentrockengewicht dieser Versuchsgruppe lag unter der Summe der Gruppen, bei denen diese Metaboliten getrennt verabreicht wurden.

24,24F₂-1,25(OH)₂D₃ war in diesem Wachteleischalentest etwa 5-6mal so aktiv wie Vitamin D₃ und auch deutlich aktiver als 1,25(OH)₂D₃. Dagegen war die Aktivität von

Tabelle 4a

Versuch 2

Eischalentrockengewicht

Diätzusatz pro kg Futter	Eischalentrockengewicht in mg pro Tier und Tag	
	$\bar{x}$	$\pm s$
negative Kontrolle	63	14
2,0 µg Vitamin D ₃	209	67
3,5 µg Vitamin D ₃	488	75
5,0 µg Vitamin D ₃	686	23
0,76 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	138	26
1,16 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	462	65
4,61 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	87	6
0,76 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,61 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	374	88
1,16 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,61 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	450	101

3 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Versuchsgruppe

Tabelle 4b

Versuch 2

Eischalentrockengewicht

Diätzusatz pro kg Futter	Eischalentrockengewicht in mg pro Tier und Tag
-----------------------------	---

	$\bar{x}$	$\pm s$
0,41 μg 24,24F ₂ -1,25(OH) ₂ D ₃	224	79
0,82 μg 24,24F ₂ -1,25(OH) ₂ D ₃	536	99
0,79 μg 24F-1,25(OH) ₂ D ₃	80	39
1,58 μg 24F-1,25(OH) ₂ D ₃	79	18
0,73 μg 1 α (OH)D ₃	96	25
1,12 μg 1 α (OH)D ₃	125	28
2,09 μg 1,25(OH) ₂ D ₂	171	21
0,79 μg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	79	32
1,58 μg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	72	8
3,16 μg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	160	53

3 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Versuchsgruppe

24F-1,25(OH) $_2$ D $_3$ bedeutend geringer als die des difluorierten Analogons, eine genaue Aussage ließ sich aufgrund der zu niedrigen Dosierung nicht treffen.

Auch die Dosierungen von 1 α (OH)D $_3$ waren für eine sichere Interpretation zu niedrig; dieses Analogon scheint jedoch auch im Wachteleischalentest eine geringere Aktivität als 1,25(OH) $_2$ D $_3$, aber eine höhere als Vitamin D $_3$ zu besitzen.

2,09 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_2$ konnten das Eischalentrockengewicht nicht in dem Maße erhöhen wie 2,0 μ g Vitamin D $_3$.

Während 0,79 μ g und 1,58 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$ die Eischalengewichte der entsprechenden Versuchsgruppe nicht deutlich über den Wert der Kontrollgruppe anhoben, ergeben 3,16 μ g/kg ein Eischalentrockengewicht von 160 mg.

3.2.3 Versuch 3

In diesem Versuch sollte der stimulierende Effekt von 24,25(OH) $_2$ D $_3$ auf die Wirkung von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ genauer untersucht werden. Im vorhergehenden Versuch hatte sich gezeigt, daß ein synergistischer Effekt eher bei niederen 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Konzentrationen zu erwarten ist. Neben der Kontroll- und den drei Standardrationen mit Vitamin D $_3$ wurden also drei Rationen mit verschiedenen, im Vergleich zu Versuch 2 reduzierten Konzentrationen mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$, eine Ration mit 24,25(OH) $_2$ D $_3$ sowie entsprechende Kombinationen der beiden Metabolitrationen eingesetzt.

Nach einer Depletionsperiode von 19 Tagen wiesen die in diesem Versuch eingesetzten 20 Wochen alten Wachteln ein durchschnittliches Eischalentrockengewicht von 80 mg auf. Die 12 Wachteln jeder Versuchsgruppe wurden nach dem unter 3.1.4 beschriebenen Verfahren auf je vier Käfige verteilt. Die Versuchsperiode erstreckte sich über 17 Tage.

Ergebnisse

Von den 132 in diesem Versuch eingesetzten Wachteln starben 5 (= 4 %) während der Versuchsperiode. Zwischen den Verlusten in den einzelnen Versuchsgruppen und den verschiedenen Rationen konnte keine Beziehung hergestellt werden.

In der negativen Kontrollgruppe ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 79 mg. Die Eischalentrockengewichte der Vitamin D_3 -Gruppen zeigten einen deutlichen Anstieg, eng korreliert mit den entsprechenden Konzentrationen. Das gleiche gilt, wenn auch nicht so deutlich, für den Futterverzehr dieser Gruppen. Auch bei den Wachteln, die nur $1,25(OH)_2D_3$ erhielten, war ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg von Eischalentrockengewicht und Futterverzehr zu beobachten. Bei der $24,25(OH)_2D_3$ -Gruppe ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 99 mg, ein Wert, der nur knapp über dem der Kontrollgruppe lag. Auffallend war der geringe Futterverzehr dieser Versuchsgruppe.

Auch für die Kombinationsgruppen ergab sich eine von den $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentrationen abhängige Wirkung auf Eischalentrockengewicht und Futterverzehr. Die Eischalentrockengewichte lagen jedoch über denen der entsprechenden $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen. Durch die kombinierte Verabreichung der Metaboliten wurden sogar Eischalentrockengewichtswerte erreicht, die über denen der Summe bei Einzelverabreichung lagen. Dieser Effekt wurde um so deutlicher, je weiter das Dosierungsverhältnis zwischen den beiden Metaboliten war bzw. je geringer die Konzentrationen von $1,25(OH)_2D_3$ waren. Der Futterverzehr der Kombinationsgruppen wies keine deutlichen Unterschiede zu denen der entsprechenden $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen auf.

Tabelle 5

Versuch 3

FuttermverzehrEischalentrockengewicht

Diätzusatz pro kg Futter	Futtermverzehr in g pro Tier und Tag	Eischalentrocken- gewicht in mg pro Tier und Tag	
		$\bar{x}$	$\pm s$
negative Kontrolle	—	79	13
2,0 µg Vitamin D ₃	20,8	229	90
3,5 µg Vitamin D ₃	24,1	493	102
5,0 µg Vitamin D ₃	25,5	690	35
0,27 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	20,9	119	28
0,54 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	22,8	284	59
0,81 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	24,2	494	115
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	17,8	99	19
0,27 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ +			
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	19,9	198	33
0,54 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ +			
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	23,0	397	108
0,81 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ +			
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	24,6	534	60

4 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Versuchsgruppe

3.2.4 Versuch 4

In Versuch 3 konnte ein deutlicher stimulierender Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich der Eischale aufgezeigt werden. Ob ein ähnlicher synergistischer Effekt auch am Parameter Knochenaschegehalt feststellbar ist, sollte in Versuch 4 geklärt werden. Auch die Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf den Knochen war bisher noch nicht untersucht worden.

Die Wachteln, die in diesem Versuch eingesetzt wurden, waren zu Versuchsbeginn 28 Wochen alt. Nach einer 19tägigen Depletionsperiode wiesen die Tiere ein durchschnittliches Eischalentrockengewicht von 65 mg auf. Die Wachteln wurden auf insgesamt 8 Gruppen aufgeteilt; dabei wurden der Kontrollgruppe und den Vitamin D_3 -Gruppen je 9 Wachteln in 3 Käfigen und den 4 Versuchsgruppen je 12 Wachteln in 4 Käfigen zugeteilt. Um das Knochentrockengewicht zu bestimmen, wurden die Wachteln am Ende des Versuches getötet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Während des Versuches starb nur eine Wachtel (Kontrollgruppe).

Die absoluten Werte des Eischalentrockengewichts der Gruppen, die Vitamin D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und die Kombination dieser Metaboliten erhielten, lagen im Vergleich zu denen des vorhergehenden Versuches auffällig niedrig. Die Differenz betrug in allen Vitamin D_3 -Gruppen mehr als 100 mg. Möglicherweise ist dies auf das im Vergleich zu den anderen Versuchen fortgeschrittene Alter der Wachteln und deren Belastung durch die beiden vorangegangenen Versuche zurückzuführen.

Tabelle 6

Versuch 4

Knochenaschegehalt der Tibia (gepoolt)Eischalentrockengewicht

Diätzusatz pro kg Futter	Knochenasche- gehalt d.Tibia in % d.Knochen- trockengewichts	Eischalentrocken- gewicht in mg pro Tier und Tag	
		$\bar{x}$	$\pm s$
negative Kontrolle	57,3	56	9
2,0 µg Vitamin D ₃	61,5	87	3
3,5 µg Vitamin D ₃	58,4	309	62
5,0 µg Vitamin D ₃	61,7	563	28
0,27 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	58,1	91	9
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	55,4	76	9
5,63 µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	58,4	126	23
0,27 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ +			
5,42 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	58,0	127	25

negative Kontrolle und Vitamin D₃-Gruppen: 3 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe;

restliche Versuchsgruppen: 4 Käfige mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

Das Eischalentrockengewicht der negativen Kontrollgruppe betrug 56 mg. Die Werte der Vitamin D_3 -Gruppen wiesen eine der Konzentration entsprechende Steigerung auf. Für die Versuchsgruppe, die nur $1,25(OH)_2D_3$ erhalten hatte, ergab sich ein Eischalentrockengewicht von 91 mg. Wie zu erwarten war, zeigte die gleiche äquimolare Konzentration von $1,24,25(OH)_3D_3$ eine höhere Aktivität (126 mg) als $24,25(OH)_2D_3$ (76 mg), das das Eischalentrockengewicht gegenüber der Kontrolle nur geringfügig steigern konnte. Die Kombination von $24,25(OH)_2D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$ erzeugte gegenüber der Kontrolle eine höhere Steigerung (ca. 1/3) des Eischalentrockengewichts, als die Summe der Steigerungen durch die einzeln verabreichten Metaboliten ergab.

Bei den Knochenaschegehaltswerten der Vitamin D_3 -Gruppen war keine deutliche Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen festzustellen. Der Knochenaschegehalt der $24,25(OH)_2D_3$ -Gruppe lag deutlich unter dem der Kontrollgruppe. Die Werte der anderen Versuchsgruppen unterschieden sich wenig.

4 DISKUSSION4.1 Eignung des Wachteleischalentests zur
Bestimmung von Vitamin D-Metaboliten

In allen vier Versuchen konnte gezeigt werden, daß zwischen den Vitamin D_3 -Konzentrationen im Futter und dem Eischalentrockengewicht eine lineare Abhängigkeit besteht (Abb. 1). Erstmalig wurde die Eignung des Wachteleischalentests, der ursprünglich als quantitative Bestimmungsmethode für Vitamin D_3 konzipiert war, für die Ermittlung der biologischen Aktivität von $1,25(OH)_2D_3$ untersucht. Im ersten Versuch erwiesen sich die eingesetzten $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentrationen als zu hoch. In den folgenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß zwischen den $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentrationen im Futter und dem Eischalentrockengewicht eine lineare Beziehung besteht (Abb. 2). $1,25(OH)_2D_3$ ist im Wachteleischalentest mehr als doppelt so wirksam wie Vitamin D_3 . Nachdem sich dieser Test zur Bestimmung von $1,25(OH)_2D_3$, dem natürlichen Vitamin D-Metaboliten, als geeignet erwiesen hatte, konnten auch andere zur Verfügung stehende synthetische Vitamin D-Metaboliten untersucht werden.

Aufgrund der in dieser Versuchsreihe gewählten Tierzahlen (3×3 bzw. 3×4 /Gruppe; $n = 3$ bzw. 4) ist jedoch eine exakte statistische Wertbemessung weder beim Vitamin D_3 -Standard noch bei den zu untersuchenden Metaboliten möglich (GROPP und ZUCKER, 1971). Die in den einzelnen Versuchen wechselnden Bedingungen (Alter der Versuchstiere, Jahreszeit) wirkten sich auf die jeweiligen Vitamin D_3 -Standardgeraden verschieden aus. Deshalb war ein (bedingter) Vergleich der einzelnen Vitamin D-wirksamen Diätzusätze nur innerhalb, nicht aber zwischen den Versuchen möglich.

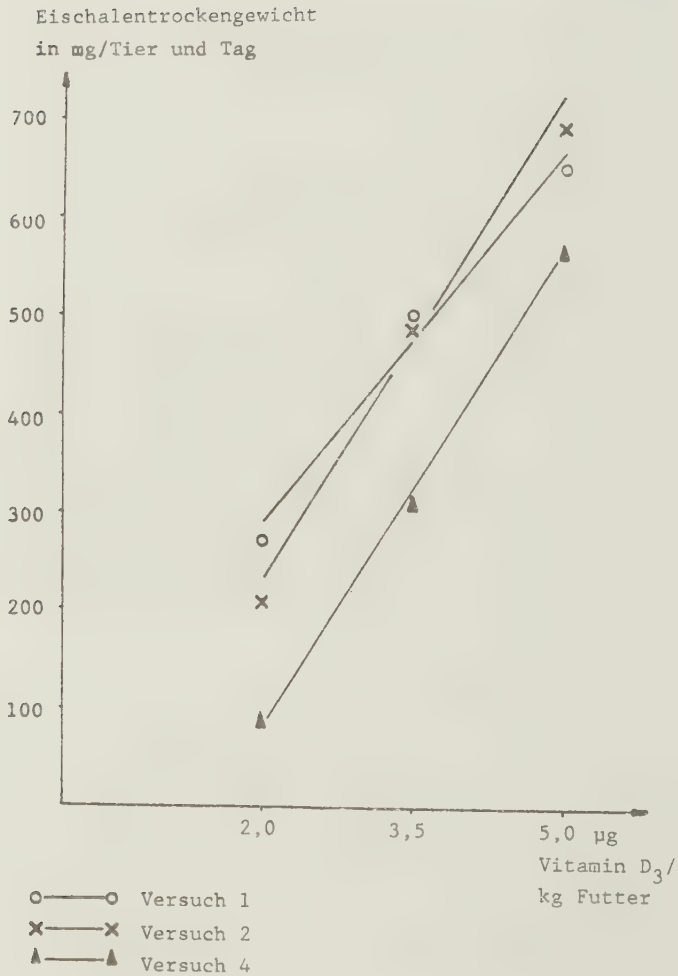


Abb. 1: Abhängigkeit des Eischalentrockengewichts von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter

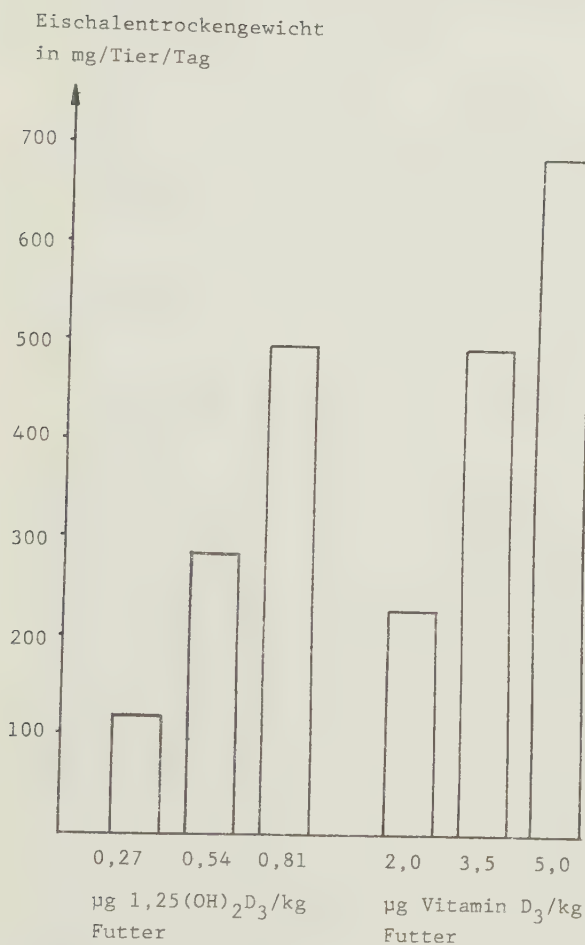


Abb. 2: Vergleich von Vitamin D_3 und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
(Versuch 3)

4.2 Die biologische Aktivität von 24,24F₂-1,25(OH)₂D₃, 24F-1,25(OH)₂D₃, 1 α (OH)D₃ und 1,25(OH)₂D₂

24,24F₂-1,25(OH)₂D₃ zeigte im Wachteleischalentest eine mehr als doppelt so hohe Aktivität wie 1,25(OH)₂D₃. Auch in anderen Untersuchungen war festgestellt worden, daß die Wirksamkeit von 24,24F₂-1,25(OH)₂D₃ bezüglich verschiedener Parameter bedeutend höher ist als die von 1,25(OH)₂D₃ (KABAKOFF et al., 1982; IKEKAWA, 1983; OKAMATO et al., 1983b; RAMBECK et al., 1985).

24F-1,25(OH)₂D₃ dagegen erwies sich im Wachteleischalentest als weit weniger wirksam. Für eine exakte Aktivitätsbestimmung war dieses 1,25(OH)₂D₃-Analogon zu niedrig dosiert, seine Aktivität ist etwa 2-4mal geringer als die von 1,25(OH)₂D₃. Dies stimmt überein mit den Untersuchungen von RAMBECK et al. (1985) an Ratten und Hühnerküken. Die hohe biologische Aktivität von 24,24F₂-1,25(OH)₂D₃ wird vor allem auf die Verhinderung der Hydroxylierung am C-(24)-Atom und eine damit verbundene längere Halbwertszeit zurückgeführt (STERN et al., 1984). Da jedoch 24F-1,25(OH)₂D₃, bei dem die 24R-Hydroxylierung ebenfalls blockiert ist, eine bedeutend geringere Aktivität als das difluorierte Analogon und 1,25(OH)₂D₃ hat, kann die hohe Aktivität von 24,24F₂-1,25(OH)₂D₃ nicht nur auf die Hemmung der 24-Hydroxylierung zurückgeführt werden. Möglicherweise wirkt sich die starke Elektronegativität der Fluoratome auf die Affinität zum Rezeptor aus. Die geringe Aktivität von 24F-1,25(OH)₂D₃ ist unter Umständen auf eine, ebenfalls durch das Fluoratom verursachte, beschleunigte Hydroxylierung an der zweiten Bindungsstelle des C-(24)-Atoms zurückzuführen.

1 α (OH)D₃ zeigte in verschiedenen Untersuchungen (RAMBECK et al., 1984a) die gleiche Wirksamkeit wie 1,25(OH)₂D₃. Die 25-Hydroxylierung dieses Analogons in der Leber, die zur Entstehung von 1,25(OH)₂D₃ führt, scheint nicht limi-

tierend zu sein. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ war in den vorliegenden Untersuchungen zu nieder dosiert, dennoch konnte festgestellt werden, daß seine Wirksamkeit im Wachteleischalentest deutlich geringer ist als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zeigte bezüglich der Calciumausscheidung über die Eischale eine 6-8mal geringere Aktivität als der entsprechende Vitamin D_3 -Metabolit. Auch beim Hühnerküken besitzt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ eine geringere antirachitische Wirksamkeit als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei der Ratte jedoch zeigen beide Verbindungen die gleiche Aktivität (RAMBECK et al., 1984b).

4.3 Die biologische Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Glucosiden

Mit Hilfe der Parameter Eischalentrockengewicht und Knochenaschegehalt wurden deutliche Aktivitätsunterschiede der drei β -D-Glucopyranoside von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt. Beim Eischalentrockengewicht zeigte sowohl das C-(1)- als auch das C-(3)-Glucosid eine nur sehr geringe Aktivität. Dagegen war die Wirksamkeit des C-(25)-Glucosids bedeutend höher (Abb. 3); sie war etwa halb so hoch wie die von Vitamin D_3 und etwa 4-5mal niedriger als die des Aglycons. Beim Knochenaschegehalt war der Unterschied zwischen den Glucosiden noch deutlicher. Während das C-(1)- und das C-(3)-Glucosid in den beiden eingesetzten Dosierungen bei diesem Parameter die niedere Vitamin D_3 -Dosierung nicht erreichen konnten, was den Ergebnissen beim Eischalentrockengewicht entsprach, zeigte das C-(25)-Glucosid eine etwa gleich große Wirkung auf den Aschegehalt wie Vitamin D_3 . Die Wirkung dieser Verbindung auf die Mineralisierung des Knochens scheint also vergleichsweise höher zu sein als seine Wirkung auf die Calciumausscheidung über die Eischale.

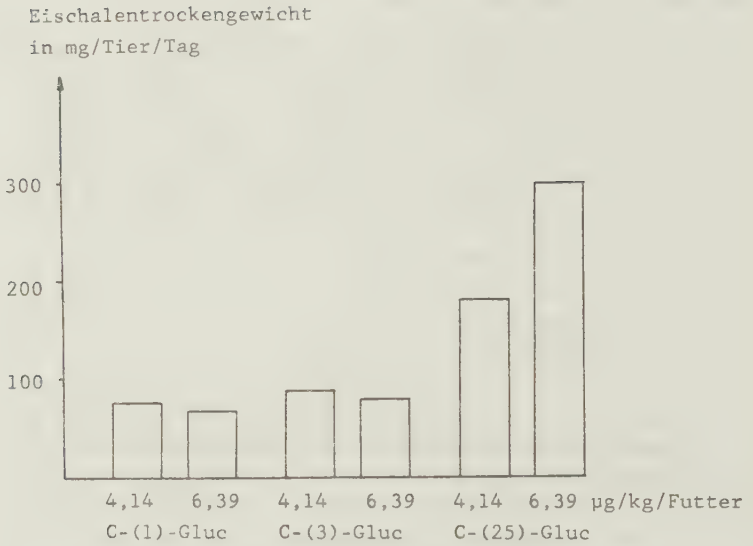


Abb. 3: Vergleich der drei 8-D-Glucopyranoside von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Eischalentrockengewicht

Auch RAMBECK et al. (1984c) konnten an Untersuchungen mit rachitischen Kücken zeigen, daß sich das C-(25)-Glucosid bezüglich der Calciummobilisation aus dem Knochen keine so hohe Aktivität besitzt wie bezüglich anderer Vitamin D-abhängiger Parameter. Bestätigt sich dies in weiteren Versuchen auch beim Säugetier, so würde dies bedeuten, daß das C-(25)-Glucosid einen therapeutischen Vorteil gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt, einerseits wegen der größeren therapeutischen Breite, andererseits wegen seiner geringeren Fähigkeit, Calcium aus dem Knochen zu mobilisieren.

4.4 Die Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Die unterschiedlichen Wirkungen der Vitamin D_3 -Metaboliten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ bei einzelner und für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombinierter Verabreichung zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde mit Hilfe des Wachteilschalentests untersucht. Die Steigerung des Eischalentrockengewichts gegenüber der Vitamin D-arm ernährten negativen Kontrollgruppe war bei $5,42 \mu\text{g } 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{kg}$ nur gering, eine um den Faktor 20 niedrigere Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,27 \mu\text{g}/\text{kg}$) erbrachte einen stärkeren Anstieg. Die Aktivität von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist in diesem Test demnach mehr als 20mal niedriger als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, ebenfalls 20mal so hoch wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dosiert ($5,63 \mu\text{g}/\text{kg } 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$), ergab eine doppelt so hohe Steigerung gegenüber der negativen Kontrolle. Die Wirksamkeit des dreifach hydroxylierten Metaboliten ist ca. 10mal geringer als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erzeugte gegenüber der negativen Kontrolle eine höhere Steigerung des Eischalentrockengewichts als die Summe der Steigerungen durch die einzeln verabreich-

ten Metabolite (Abb. 4). Dieser Effekt zeigte sich um so deutlicher, je geringer die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration war bzw. je weiter das Dosierungsverhältnis zwischen diesen Metaboliten war. Bei einem Dosierungsverhältnis von 1:20 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ergaben sich Steigerungen, die ungefähr zwischen 30 % und 100 % höher lagen als die Summe der durch die einzeln verabreichten Metaboliten verursachten Steigerungen. Bei einem engen Dosierungsverhältnis (1:6,6) lag die Steigerung nur noch geringfügig höher (ca. 10 %). Die bisher nur bezüglich der intestinalen CaBP-Synthese (RAMBECK und ZUCKER, 1985) und dem Knochenaschegehalt (GORALCZYK, 1985) beim rachitischen Hühnerküken nachgewiesene synergistische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei gemeinsamer Verabreichung gilt also auch für die Calciumausscheidung über die Eischale.

Nach HOLICK et al. (1973) ist die (geringe) antirachitische Aktivität von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf dessen Umwandlung in $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zurückzuführen. Untersuchungen an Hühnerküken, bei denen die 1-Hydroxylase in der Niere durch Strontium gehemmt wurde, zeigten, daß auch die potenzierende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, das ja unter diesen Bedingungen nicht mehr in $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ umgewandelt werden kann, nicht mehr auftritt (RAMBECK und ZUCKER, 1985).

In Untersuchungen an rachitischen Hühnerküken konnte durch die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch bezüglich des Knochenaschegehalts eine stärkere Wirkung festgestellt werden als durch die Summe der Einzelmetabolitwirkungen (GORALCZYK, 1985). Dieser Effekt konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Der Knochenaschegehalt steigt bei der Wachtelhenne wohl auch deshalb nicht weiter an, weil bei der Kombination der beiden Metaboliten sowieso

Zunahme des Eischalentrocken-
gewichts gegenüber der negativen
Kontrolle in mg/Tier/Tag

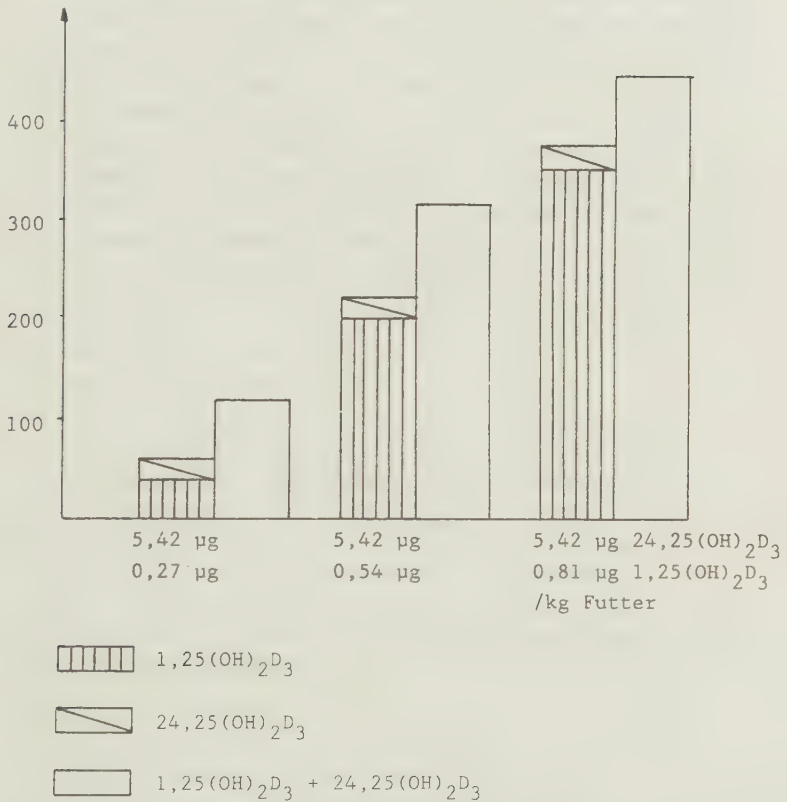


Abb. 4: Vergleich von 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ mit den entsprechenden Kombinationen der beiden Metaboliten

schon vermehrt Calcium über die Eischale abgegeben wird.

Die verstärkende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann vielleicht dazu genützt werden, die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosierungen bei der Therapie der renalen Osteodystrophie zu reduzieren. Dies könnte um so mehr gerechtfertigt sein, als ja $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einer Demineralisierung des Knochens vorzubeugen scheint (VOIGTS et al., 1983). Auch verschiedene neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beide für die Entwicklung und die Mineralisation des Knochens notwendig sind, aber unterschiedliche (ORIMO, 1985a; VUKICEVIC et al., 1985), zum Teil sogar einander entgegengesetzte (ORIMO, 1985b) Funktionen ausüben.

In einer Versuchsreihe mit vier Wachteleischalentests, bei denen neben dem Eischalentrockengewicht zum Teil auch der Knochenaschegehalt und der Futterverzehr ermittelt wurde, konnte gezeigt werden, daß sich dieses Verfahren nicht nur zur Bestimmung der Vitamin D_3 -Konzentration im Futter, sondern auch zur Untersuchung der biologischen Aktivität von Vitamin D-Metaboliten eignet. Bei depletierten Wachtelhennen besteht eine lineare Beziehung zwischen Vitamin D_3 - bzw. Vitamin D-Metabolit-Konzentration im Futter und der Eischalentrockengewichtsausscheidung pro Tier und Tag.

$1,25(OH)_2D_3$ erwies sich im Wachteleischalentest mehr als doppelt so wirksam wie Vitamin D_3 . Beim Vergleich des Einflusses der am C-Atom (24) fluorierten $1,25(OH)_2D_3$ -Analoge auf das Eischalentrockengewicht zeigte $24F-1,25(OH)_2D_3$ in der eingesetzten Dosierung nur eine sehr geringe Aktivität. Dagegen war $24,24F_2-1,25(OH)_2D_3$ mehr als doppelt so aktiv wie $1,25(OH)_2D_3$, das natürliche Steroidhormon. Die Wirksamkeit von $1\alpha(OH)D_3$ im Wachteleischalentest war deutlich niedriger als die von $1,25(OH)_2D_3$. $1,25(OH)_2D_2$ unterscheidet sich von dem entsprechenden Vitamin D_3 -Metaboliten bezüglich des Einflusses auf die Eischalentrockengewichtsausscheidung außerordentlich, seine Aktivität ist etwa 6-8mal niedriger.

Die drei in den Versuchen eingesetzten $1,25(OH)_2D_3$ - β -D-Glucopyranoside zeigten deutliche Aktivitätsunterschiede. Sowohl in Bezug auf die Erhöhung des Eischalentrockengewichts als auch der Anhebung des Knochenaschegehalts zeigte das C-(1)- und das C-(3)-Glucosid eine sehr geringe Aktivität. Das C-(25)-Glucosid hingegen wies beim Eischalentrockengewicht eine bedeutend höhere Wirksamkeit auf; sie war etwa 4-5mal niedriger als die des

Aglykons. Der Knochenaschegehalt wurde durch das C-(25)-Glucosid vergleichsweise stärker angehoben als das Eischalentrockengewicht. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwies sich im Wachteleischalentest etwa 20mal, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ etwa 10mal weniger wirksam als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Durch die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden höhere Eischalentrockengewichtswerte erreicht, als sich aus der Addition der Werte bei getrennter Verabreichung der beiden Metaboliten ergaben. Dieser synergistische Effekt war um so deutlicher, je geringer die $1,25(\text{OH})_2$ -Konzentration bzw. je weiter das Dosierungsverhältnis zwischen den beiden Metaboliten war.

Natural and synthetic metabolites of Vitamin D in the Japanese quail egg shell test

In four Japanese quail egg shell tests egg shell dry weight as well as in some cases bone ash content and feed consumption was determined.

This assay proved to be useful not only for determination of Vitamin D_3 -concentration in feed, but also for the investigation of the biological activity of Vitamin D-metabolites. In depleted quail hens there is a linear correlation between concentration of Vitamin D_3 and Vitamin D-metabolites, respectively, in the feed and the egg shell dry weight/animal/day.

In this test, $1,25(OH)_2D_3$ was found to be more than twice as active als Vitamin D_3 . A comparison was carried out between two C-(24)-fluorinated $1,25(OH)_2D_3$ -analogues and $1,25(OH)_2D_3$. $24F-1,25(OH)_2D_3$ showed only very little activity. $24,24F_2-1,25(OH)_2D_3$, on the other hand, was more than twice as active as $1,25(OH)_2D_3$. Compared with $1,25(OH)_2D_3$, the activity of $1\alpha(OH)D_3$ was markedly decreased. Concerning its impact on the egg shell weight, $1,25(OH)_2D_2$ differs extremly from this synthetic Vitamin D_3 -metabolite.

C-(1)- and C-(3)- β -D-glucopyranoside showed very little effect regarding the increase of egg shell weight as well as the increase of bone ash content, whereas C-(25)-glycoside proved to have a far stronger impact on the egg shell weight, it was only some 4-5 times less active than the aglycon. Bone ash content also was increased comparatively stronger than egg shell dry weight.

In Japanese quail egg, shell test $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ proved to be some 20 times less effective and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ some 10 times less effective than $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Combined administration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ led to higher egg shell dry weight values than those resulting from separate administration of the two metabolites. This effect was more pronounced, when $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was given in low concentration.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AMEENUDDIN, S., M. SUNDE, H.F. DELUCA, N. IKEKAWA,
Y. KOBAYASHY (1982):
24-Hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃: is it required
for embryonic development in chicks.
Science 217, 451-452
- AVIOLI, L.V. (1974):
The therapeutic approach to hypoparathyroidism.
Amer. J. Med. 57, 34-42
- BABARYKIN, D., V.K. BAUMANN, M.Y. VALINIETSE,
R.L. ROSENTAL (1982):
Similarity and differences in 1,25(OH)₂D₃ and
24,25(OH)₂D₃ antirachitic effects.
In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endo-
crinology of calcium metabolism. (Ed.: A.W. Norman,
K. Schaefer, D. v. Herrath, H.G. Grigoleit)
Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1201-1203
- BAUMEISTER, M. (1973):
Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-
Bestimmung.
Vet. Med. Diss., München
- BELL, N.H. and P.H. STERN (1978):
Hypercalcemia and increases in serum hormone value
during prolonged administration of 1,25DHCC.
New Engl. J. Med. 298, 1241-1243
- BORDIER, P., H. RASMUSSEN, P. MARIE, L. MIRAVET, J. GENIS,
A. RYCKWAERT (1978):
Vitamin D metabolites and bone mineralisation in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 284-294
- BISHOP, C.W., N.C. KENDRICK, H.F. DELUCA (1983):
Induction of calcium-binding-protein before 1,25-dihydroxy-
vitamin D₃ stimulation of duodenal Ca-uptake.
J. Biol. Chem. 258, 1305-1310

BOUILLON, R. and H. VAN BAELEN (1980):

Vitamin D-transport. '

Acta Paediatr. Belg. 33, 3-7

BRAGG, D.B., J. FLOYD, E.L. STEPHENSON (1971):

Factors affecting the transfer of Ca (^{45}Ca) from hen's diet to egg shell.

Poult. Sci. 50, 167-174

BROMMAGE; R., K. JARNAGIN, H.F. DELUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983):

1- But not 24-hydroxylation of vitamin D is required for skeletal mineralisation in rats.

Am. J. Physiol. 244, (Endocrinol. Metab. 7) E298-E304

CAPEN, C.C., G.F. HOFSSISS, A.W. NORMAN (1979):

1,25-Dihydroxycholecalciferol and prevention of parturient hypocalcemia and paresis ("milk fever") in pregnant dairy cows.

In: Vitamin D, Basic research and its clinical application (Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E. Mawer, T. Suda).

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 667-674

CHEN, T.C., L. CASTILLO, M. KORYCKA-DAHL, H.F. DELUCA (1974):

Role of Vitamin D-metabolites in phosphate transport of rat intestine.

J. Nutr. 104, 1056-1060

CHRISTIANSEN, C. (1983):

Chronic renal failure and Vitamin D metabolites: a status report.

J. Steroid Biochem. 19, 517-523

COBURN, J.W., E.G.C. WONG, D.J. SHERRARD (1980):

Use of 24,25-dihydroxyvitamin D_3 in dialysis osteomalacia: Preliminary results, abstracted.

Clin. Res. 28, 532

CRILLY, R.G., A. HORSMAN, M. PEACOCK, B.E.C. NORDIN (1981):
The Vitamin D-metabolites in pathogenesis and management
of osteoporosis.

G. Med. Res. Op. 7, 337-348

DEKEL, S., R. SALAMA, S. EDELSTEIN (1983):

The effect of vitamin D and his metabolites on fracture
repair in chicks.

Clinical Science 65, 429-436

DELLING, G., A. SCHULZ, W. SCHULZ (1975):

Morphologische Klassifikation der renalen Osteopathie.

Mels. Med. Mit. 49, 133

DELLING, G. (1981):

Der Einfluß von 1,25-Dehydroxycholecalciferol auf die
renale Osteopathie.

Nieren- und Hochdruckkrankh. 10, 159-165

DELUCA, H.F. (1977):

The Vitamin D endocrine system in health and disease.

Proc. Royal College Physicians and Surgeons, Toronto,
Canada, 216-255

DELUCA, H.F. (1981a):

Recent advances in the metabolism of Vitamin D.

Ann. Rev. Physiol. 43, 199-209

DELUCA, H.F. (1981b):

The biochemical basis of renal osteodystrophy and post-
menopausal osteoporosis: a view from the vitamin D system.

Curr. Med. Res. Opin. 7, 279-293

DELUCA, H.F. and H.K. SCHNOES (1983):

Vitamin D: Recent advances.

Ann. Rev. Biochem. 52, 411-439

DREZNER, M.K., K.W. LYLES, M.R. HAUSSLER, J.M. HARRELSON
(1980):

Evaluation of a role for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the
pathogenesis and treatment of X-linked hypophosphatämia
rickets and osteomalacia.

J. Clin. Invest. 66, 1020-1032

ENDO, H., M. KİYOKI, K. KAWASHIMA, T. NARUCHI and
Y. HASHIMOTO (1980):

Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate
bone formation of chick embryonic femur in vitro.

Nature 286, 262-264

ENDO, H., M. KİYOKI, K. KAWASHIMA, S. ISHIMOTO (1982):

24,25(OH)₂D₃ is active in stimulating the bone formation
in vitro. In: Vitamin D, chemical, biochemical and clinical
endocrinology of calcium metabolism (Ed: A.W. Norman,
K. Schaefer, D. v. Herrath, H.G. Grigoleit).

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 173-175

FLURY, W. und B. HALDEMANN (1981):

Therapie mit Vitamin D und D-Metaboliten.

Schweiz. med. Wschr. 111, 314-321

FÜRST, A., L. LABLER und W. MEIER (1983):

Synthese von β-D-Glucopyranosiden einiger hydroxylierter
Vitamin-D-Verbindungen.

Helv. Chim. Acta 66, 2093-2102

GARABEDIAN, M., M.B. DEBOIS, M.T. CORVAL, E. PEZANT and
S. BALSAN (1978):

Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-
hydroxycholecalciferol by cartilage.

Endocrinology 102, 1262-1268

GORALCYK, R. (1985):

Die biologische Aktivität natürlicher und synthetischer
1,25-Dihydroxycholecalciferol-Metabolite beim Hühnerküken.
Vet. Med. Diss., München

GREGOROVIĆ, V., F. SKUSEK, F. KESNAR, L. BEKS (1966):

Kritische Auswertung der Wirkung unterschiedlicher Dosen
von Vitamin D zur Vorbeuge der hypocalcämischen Gebär-
parese beim Rind.

4. Int. Tag. Rinderkrankh., Zürich 1966, 462-466

- GROPP, J. und H. ZUCKER (1969):
Vitamin-D-Bedarfsstudie an der japanischen Wachtel.
Vortrag, Kurzfassung in:
Z. Tierphys. Tierernährg. und Futtermittelkde. 25, 121-122
- GROPP, J. und H. ZUCKER (1971):
Vitamin D₃-Bestimmung im biologischen Verfahren an der japanischen Wachtel.
Arch. Geflügelkde. 35, 41-45
- HART, E.H., H.F. DELUCA, S. YAMADA and H. TAKAYAMA (1984):
Hydroxylation of carbon-24 of 25-hydroxycholecalciferol is not necessary for normal embryonic development in chickens.
J. Nutr. 114, 2059-2065
- HENRY, H.L., A.N. TAYLOR and A.W. NORMAN (1977):
Response of chick parathyroid glands to the vitamin D-metabolites, 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol.
J. Nutr. 107, 1918-1926
- HENRY, H.L. (1982):
The role of parathyroid hormone in the regulation of the metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃.
Miner. Elekt. Metab. 8, 179-187
- HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984):
Vitamin D: Metabolism and biological actions.
Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520
- HOLICK, M.F., A. KLEINER-BOSALLER, H.K. SCHNOES, P.M. KASTEN, J.T. BOYLE, H.F. DELUCA (1973):
1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃: a metabolite of Vitamin D₃ effective on intestine.
J. Biol. Chem. 248, 6691-6696
- HORST, R.L., J.L. NAPOLI, T. LITTLEDIKE (1982):
Discrimination in the metabolism of orally dosed ergocalciferol and cholecalciferol by the pig, rat and chick.
Biochem. J. 204, 185-189

HUGHES, M.R., T.A. McCAIN, S.I. CHANG, M.R. HAUSSLER (1977):

Presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glycoside in the calcinogenic plant *Cestrum diurnum*.

Nature 268, 347-348

IKEKAWA, N. (1983):

Synthesis and biological activity of vitamin D_3 analogues.

J. steroid. Biochem. 19, 907-911

IMRIE, M.H., P.F. NEVILLE, A.W. SNELGROVE, H.F. DELUCA (1967):

Metabolism of Vitamin D_2 and Vitamin D_3 in the rachitic chick.

Arch. Biochem. Biophys. 120, 525-532

JARNAGIN, K., R. BROMMAGE, H.F. DELUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983):

1- But not 24-hydroxylation of vitamin D is required for growth and reproduction in rats.

Am. J. Physiol. 244 (Endocrinol. Metab. 7) E290-E297

JONES, G., H.K. SCHNOES, H.F. DELUCA (1976):

An in vitro study of Vitamin D_2 -hydroxylase in the chick.

J. Biol. Chem. 251, 24-28

KABAKOFF, B.D., N.C. KENDRICK, D. FABER, H.F. DELUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1982):

Determination of biological activity of 24,24-difluoro- $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in the chick using a new method for assessing intestinal calcium uptake.

Arch. Biochem. Biophys. 215, 582-588

KALLFELZ, F.A., P.N. SMITH, R.H. WASSERMANN (1983):

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels related to bovine hypocalcemia.

Proc. 5th Int. Conf. Production disease in farm animals, Uppsala, Sweden, 39-43

- KANIS, J.A., C.B. BROWN, E.C. CAMERON, T. CUNDY, M.M. PLATTS, A. PATERSON, R.G.G. RUSSEL (1981):
The role of vitamin D metabolites in the osteomalacia of renal disease.
C. Med. Res. Op. 7, 294-314
- KANIS, J.A., D. GUILLANO-CUMMING, A.D. PATERSON, R.G.G. RUSSEL (1982):
The role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in calcium homeostasis. In: Vitamin D, chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. (Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H.G. Grigoleit) Walter de Gruyter, Berlin/New York, 157-167
- KNUTSON, J.C. and H.F. DELUCA (1974):
25-Hydroxy-vitamin D_3 -24-hydroxylase. Subcellular location and properties.
Biochemistry 13, 1543-1548
- KODICEK, E. (1969):
Studies on vitamin D metabolism. Vitamin D esters. In: H.F. DeLuca and J.W. Suttie. The fat soluble vitamins. The University of Wisconsin press, Madison, 1969, 81-84
- KRAFT, D., G. OFFERMANN, R. STELDINGER, D. GAWLIK (1979):
Effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ on experimental rickets.
Res. Comm. Path. Pharm. 26, 571-580
- KUMAR, R., H.K. SCHNOES and H.F. DELUCA (1978):
Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D_3 and 1,25-dihydroxy-vitamin D_3 -24-hydroxylase.
J. Biol. Chem. 253, 3804-3809
- KUMAR, R., J.M. LONDOWSKI, M.P. MURARI, S. NAGUBANDI (1982):
Synthesis and biological activity of vitamin D_2 3- β -glucosiduronate and vitamin D_2 3- β -sulfate: role of vitamin D_2 conjugates in calcium homeostasis.
J. steroid Biochem. 17, 495-502

KUMAR, R. (1984):

Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Physiol. Rev. 2, 478-504

KUNZ, W. und T. HÄNICHEN (1981):

Solanum malacoxylon: Untersuchungen der Verträglichkeit der zur Prophylaxe der Hypocalcämischen Gebärlähmung empfohlenen Mengen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 421-424

LAM, H.-Y., H.K. SCHNOES, H.F. DELUCA (1977):

Synthesis of 1 α -hydroxyergocalciferol.

Steroids 30, 671-677

LEVINE, B.S., D.B.N. LEE, N. BRAUTBAR, M.W. WALLING,

C.T. KLEEMANN, J.W. COBURN (1979):

Effects on mineral homeostasis of 1,25(OH)₂D₃ and

24,25(OH)₂D₃, alone and in combination, in rats.

In: Vitamin D, basic research and its clinical application (Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda).

Walter de Gruyter Berlin/New York, 429-430

LORÉ, F., R. NUTI, A. VATTIMO, E. CANIGGA (1984):

Vitamin D-metabolites in postmenopausal osteoporosis.

Horm. metabol. Res. 16, 58

MALLUCHE, H.H., H. HENRY, W.A. MEYER, D. SHERMAN,

S.G. MASSRY, A.W. NORMAN (1979):

Effects and interaction of 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃

on bone. In: Vitamin D: Basic research and its clinical

application. (Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath,

H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer,

T. Suda)

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 425-427

MAZUR, Z., B. MACHNAI, J. STERLIN, B.Z. WEINER, A. RUBIN-

STEIN, N. KAIN, J. FRIEDEMANN, N. SEIFE, A. DEFRIES,

E. MEIR, N. SACHS (1980):

The prevention of milk fever with 1α -hydroxyvitamin D_3 ($1\alpha(OH)D_3$) administered in a precise regimen.
Proc. 11th Int. Congr. Disease of Cattle, Tel Aviv 1980, 1262-1272

MEIER, W. (1981):

Die chemische Entwicklung von Rocatrol.
Nieren- und Hochdruckkrankh. 10, 175-179

MUIRHEAD, N.G.R., D. CATTO, N. EDWARD (1980):

Comparison of $1,25(OH)_2D_3$ and $24,25(OH)_2D_3$ in the long-term treatment of renal osteodystrophy.
Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc. 17, 543-547

NAGUBANDI, S., R.KUMAR, J.M. LONDOWSKI, R.A. CORRADINO, P.S. TIETZ (1980):

Role of vitamin D Glucosiduronate in calcium homeostasis.
J. Clin. Invest. 66, 1274-1280

NIELSON, H.E., I.K. ROMER, F. MELSON, M.F. CHRISTENSEN, H.E. HANSEN (1980):

1 -hydroxyvitamin D_3 -treatment of nondialysed patients with chronic renal failure. Effects on bone, mineral metabolism and kidney function.

Clin. Nephrol. 13, 103-108

NORMAN, A.W. and H. HENRY (1974):

$1,25$ -dihydroxycholecalciferol - a hormonally active form of Vitamin D_3 .

Rec. Prog. Horm. Res. 30, 431-480

NORMAN, A.W., H.L. HENRY, H.H. MALLUCHE (1980):

$24R,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 are both indispensable for calcium and phosphorus homeostasis.

Life Science 27, 229-237

NORMAN, A.W., V.L. LEATHERS, J.E. BISHOP, S. KADOWAKI, B.E. MILLER (1982a):

$24R,25$ -dihydroxyvitamin D_3 has unique receptors (parathyroid gland) and biological responses (egg hatchability).

- In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism (Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H.G. Grigoleit)
Walter de Gruyter, Berlin/New York, 147-151
- NORMAN, A.W., J. ROTH, L. ORCI (1982b):
The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins).
Endocrine Reviews 3, 331-366
- NORMAN, A.W., V. LEATHERS, J.E. BISHOP (1983):
Normal egg hatchability requires the simultaneous administration to the hen of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and 24R,25-dihydroxycholecalciferol.
J. Nutr. 113, 2505-2515
- ORIMO, H. (1985a):
Does 24R,25(OH)₂D₃ have a beneficial effect in osteoporosis?
Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Italy, 1985, Abstracts, 105
- ORIMO, H. (1985b):
Study on the biological action of 24R,25(OH)₂D₃-hypocalcemic effect in rats.
Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Italy, 1985, Abstracts, 100
- ORNOY, A., D. GOODWIN, D. NOFF, S. EDELSTEIN (1978):
24,25-Dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation.
Nature 276, 517-519
- OKAMATO, S., C. SMITH, H.F. DELUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983a):
Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxycholecalciferol in chicks.
J. Nutr. 113, 1607-1612

OKAMATO, S., Y. TANAKA, H.F. DELUCA, Y. KOBAYASHI,
N. IKEKAWA (1983b):

Biological activity of 24,24-difluoro-1,25-dihydroxy-
vitamin D₃.

Am. J. Physiol. 244, E159-E163

PAAREN, H.E., H.F. DELUCA, H.K. SCHNOES (1980):

Direct C(1) hydroxylation of vitamin D₃ and related
compounds.

J. Org. Chem. 45, 3253-3258

PARDRIDGE, J.J., S.-J. SHIUEY, A. BORIS, J.P. MALLON,
M.R. USKOKOVIC (1979):

Synthesis and biological activity of 24R-hydroxy-fluoro-
cholecalciferol and 1 α ,24R-dihydroxy-fluorocholecalciferol.
In: Vitamin D: Basic research and its clinical application.
(Ed.: A.W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath,
H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda)
Walter de Gruyter, Berlin/New York, 37-44

PARFITT, A.M., C.H.E. MATHEWS, R. BROMMAGE, K. JARNAGIN,
H.F. DELUCA (1984):

Calcitriol but not other metabolite of Vitamin D is
essential for normal bone growth and development in the
rat.

J. Clin. Invest. 73, 576-586

PATERSON, A.D., D.J. BEARD, D.F. GUILLAND-CUMMING,
R.G.G. RUSSEL, T. CUNDY, G. HEYNEN, J.A. KANIS (1982):
1,25(OH)₂D₃ increases renal tubular reabsorption of
calcium in man.

Fifth Workshop on Vitamin D, Williamsburgh, USA, 1982,
Abstracts, 379

PAVLOVITCH, J.H., G. COURNOT-WITMER, A. BOURDEAU,
S. BALSAN, J.A. FISCHER, G. HEYNEN (1981):

Suppressive effects of 24,25-dihydrocholecalciferol on
bone resorption induced by acute bilateral nephrectomy
in rats.

J. Clin. Invest. 68, 803-810

PEACOCK, M., P.J. HEYBURN, J.E. AARON (1977):

Vitamin D-resistant hypophosphatemic osteomalacia:
treatment with 1-hydroxyvitamin D₃.

D. Clin. Endocr. 7, (Suppl.), 231s-237s

RAMBECK, W.A., H.G. STRÖHLE, A. WETZEL, H. ZUCKER (1981a):
Calcinogenic activity of vitamin D₃ and vitamin D₃ palmitate in rat and rabbit.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 359-364

RAMBECK, W.A., H. WEISER, R. HASELBAUER, H. ZUCKER (1981b):
Vitamin D activity of different vitamin D₃-esters in chicken, japanese quail and in rats.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 353-358

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1982):

Vitamin D-artige Aktivität in calcinogenen Pflanzen.

Zbl. Vet. Med. A 29, 289-296

RAMBECK, W.A., H. WEISER, H. ZUCKER (1984a):

Biological activity of glycosides of vitamin D₃ and 1 α -Hydroxy-vitamin D₃.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 54, 25-34

RAMBECK, A.W., H. WEISER, H. ZUCKER (1984b):

Biological activity of 1 α ,25(OH)₂D₂ in rachitic chicks and in rats.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 54, 135-139

RAMBECK, W.A., H. WEISER, U. HENNES, W. MEIER, H. ZUCKER (1984c):

Bioactivity of the C(1)-, C(3)- and C(25)-B-D-Glucopyranoside of 1 α ,25(OH)₂D₃.

Calcif. Tissue Int. 36, 43

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1985):

Synergistic effects of 1,25(OH)₂D₃ and 24,24(OH)₂D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on egg shell weight in Japanese quails.

In Vorbereitung

RAMBECK, W.A., H. WEISER, H. ZUCKER (1985):

Biological activity of fluorine-substituted 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in rats, in chicken and in Japanese quails.

In Vorbereitung

REEVE, K.E., H.K. SCHNOES, H.F. DELUÇA (1978):

Biological activity of 1 α -hydroxyvitamin D₂ in the rat.

Arch. Biochem. Biophys. 186, 164-167

ROUX, R., N.J. DAVICCO, B.J. CARILLO, J.P. BARLET (1979):

Solanum glaucophyllum in pregnant cows. Effect on colostrum mineral composition and plasma calcium and phosphorus levels in dams and newborn calves.

Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19, 91-101

SCHULZ, W., P. SPIEGEL, U. TRECHSEL, G. DELLING (1981):

Einjahresstudie mit Rocatrol bei Patienten mit renaler Osteopathie.

Nieren- und Hochdruckkrankh. 10, (6), 233-242

SJÖDEN, G., J.U. LINDGREN, H.F. DELUCA (1984):

Antirachitic activity of 1 α -hydroxycholecalciferol and 1 α -hydroxyergocalciferol in rats.

J. Nutr. 114, 2043-2046

SLATOPOLSKY, E., K. HRUSKA, W.E. RUTHERFORD (1975):

Current concepts of parathyreoid hormone and Vitamin D metabolism: perturbations in chronic renal disease.

Proc. Confer. Adequacy of Dialysis, 90-96

STEENBOCK, H., S.W.F. KLETZIEN, J.G. HALPIN (1932):

The reaction of the chicken to irradiated ergosterol and irradiated yeast as contrast with the natural vitamin D of fish liver oil.

J. Biol. Chem. 97, 249-264

STERN, P.H. (1981):

A monolog on analogs: In vitro effects of Vitamin D metabolites and consideration of the mineralisation question.

Calcif. Tissue Int. 33, 1-4

STERN, P.H., T. MAVREAS, Y. TANAKA, H.F. DELUCA,
N. IKEKAWA, Y. KOBAYASHI (1984):

Fluoride substitution of Vitamin D analogs at C-26 and
C-27: enhancement of activity of 25-hydroxyvitamin D
but not of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone and intestine
in vitro.

J. Pharm. Exper. Ther. 229, 9-13

TANAKA, Y., R.M. SHEPARD, H.F. DELUCA, H.K. SCHNOES (1979a):
In vitro production of 1,25-dihydroxyvitamin D by rat
placental tissue.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5033-5035

TANAKA, Y., H.F. DELUCA, Y. KOBAYASHI, T. TAGUCHI,
N. IKEKAWA, M. MORISAKI (1979b):

Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxyvitamin D₃.
Effect of blocking of 24-hydroxylation on the functions
of Vitamin D.

J. Biol. Chem. 254, 7163-7167

TANAKA, Y., I.K. WICHMANN, H.F. DELUCA, Y. KOBAYASHI,
N. IKEKAWA (1983):

Metabolism and binding properties of 24,24-difluoro-25-
hydroxyvitamin D₃.

Arch. Biochem. Biophys. 119, 536-540

TRÜGER, C. (1984):

Wirkungsvergleich von Solanum malacoxylon, Trisetum
flavescens, 1,25-Dihydroxycholecalciferol, 1,25-Dihydroxy-
ergocalciferol und 24,25-Dihydroxycholecalciferol.

Vet. Med. Diss., München

TSANG, R.C. (1983)

24,25-dihydroxyvitamin D₃: a metabolite of Vitamin D in
search of a function.

J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2, 581-584

VOIGTS, A.L., A.J. FELSENFELD, F. LLACH (1983):

The effect of calciferol and its metabolites on patients
with chronic renal failure. II. Calcitriol, 1 α -hydroxy-

vitamin D₃, and 24,25-dihydroxyvitamin D₃.

Arch. Intern. Med. 143, 1205-1211

VUKICEVIC, S., B. KREMPIEN, G. VUJICIC, C. BAGI,
A. STAVLENIC (1985):

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24R,25-dihydroxyvitamin D₃
are both necessary for bone composition of intramuscular
implants of demineralised matrix in rats.

Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Italy, 1985,
Abstracts, 99

WASSERMANN, R.H., J.D. HENION, M.R. HAUSSLER, T.A. MCCAIN
(1976):

Calcinogenic factor in Solanum malacoxylon: Evidence that
it is 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Glycoside.

Science 194, 853-855

WONG; R.G., J.F. MYSTLE, H.C. TSAI, A.W. NORMAN (1972):

Studies on calciferol metabolism. The occurrence and
biological activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bone.

J. Biol. Chem. 247, 5728-5735

ZUCKER, H., J. GROPP, J. PEH, C. ZENTZ (1967):

Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (*Coturnix
coturnix japonica*) als Labortier sowie einige Ergebnisse
von Nährstoffbedarfsuntersuchungen.

Tierärztl. Umsch. 8, 416-421

ZUCKER, H. und J. GROPP (1968):

Vitamin D₃-Bestimmung über die Eischalenbildung bei der
japanischen Wachtel.

Naturwiss. 55, 447-455

ZUCKER, H. und W.A. Rambeck (1981):

Vitamin D₃ und Vitamin D₃-metabolitartige Aktivität in
Trisetum flavescens.

Zbl. Vet. Med. A 28, 436-441

8 LEBENS LAUF

Martin Hans Kopp

25.01.1954	geboren in Eschach Vater: Friedrich Kopp, Landwirt Mutter: Hilde Kopp, geb.Beißwenger
1961 - 1965	Volksschule Eschach
1965 - 1974	Parler-Gymnasium Schwäbisch Gmünd
22.06.1974	Reifeprüfung
01.10.1974 - 31.12.1975	Grundwehrdienst
WS 1977/78 - SS 1983	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
11.05.1983	Staatsexamen
22.06.1983	Approbation als Tierarzt
01.07.1983 - 31.10.1983	Tätigkeit als Assistent in der tier- ärztlichen Praxis Dr. H. Nowotny in Eschach
01.03.1984 - 31.08.1984	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physio- logie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärzt- lichen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität München

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Professor Dr. H. Zucker herzlich danken, außerdem auf die guten Arbeitsbedingungen im Institut hinweisen.

Besonders danke ich auch Herrn Dr.habil. W.A. Rambeck für seine Hilfsbereitschaft bei der Planung der Versuche sowie seine Beratung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. J. Gropp für die gewährte Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch Frau A. Wetzel für die freundlich gewährte Beratung in technischen Fragen sowie Fräulein A. Bachhuber und den Kollegen und Kolleginnen Meiringer, Schweigert, Krommer, Pflüger, Adler, Wicklein und Goralczyk für die gern gewährte Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Darüberhinaus möchte ich den Mitarbeitern der Abteilung am Oberwiesefeld, insbesondere Frau E. Stadler und Herrn Dr. K. Sternik, für die entgegenkommende Hilfe und Beratung danken.

